

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



556903

(43) 国際公開日  
2004 年 11 月 25 日 (25.11.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/101794 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/29, C12Q 1/68 (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 平尾 宜司 (HIRAO, Takashi) [JP/JP]; 〒5778520 大阪府東大阪市御厨栄町1丁目5番7号 ハウス食品株式会社内 Osaka (JP).  
(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/006913 平元 雅之 (HIRAMOTO, Masayuki) [JP/JP]; 〒5778520 大阪府東大阪市御厨栄町1丁目5番7号 ハウス食品株式会社内 Osaka (JP). 渡辺 聡 (WATANABE, Satoshi) [JP/JP]; 〒5778520 大阪府東大阪市御厨栄町1丁目5番7号 ハウス食品株式会社内 Osaka (JP). 正野 仁慈 (SHONO, Jinji) [JP/JP]; 〒5778520 大阪府東大阪市御厨栄町1丁目5番7号 ハウス食品株式会社内 Osaka (JP).  
(22) 国際出願日: 2004 年 5 月 14 日 (14.05.2004)  
(25) 国際出願の言語: 日本語  
(26) 国際公開の言語: 日本語  
(30) 優先権データ:  
特願2003-139513 2003 年 5 月 16 日 (16.05.2003) JP (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル 3階 Tokyo (JP).  
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): ハウス食品株式会社 (HOUSE FOODS CORPORATION) [JP/JP]; 〒5778520 大阪府東大阪市御厨栄町 1 丁目 5 番 7 号 Osaka (JP). (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, [続葉有]

(54) Title: QUANTITATIVE PCR DETECTION METHOD FOR PLANT OF SPECIFIED GENUS IN FOOD OR FOOD RAW MATERIAL

(54) 発明の名称: 食品または食品原材料中の特定植物属の定量的PCR検出法

(57) Abstract: A method of determining the amount of plant of specified genus in food or food raw material according to the PCR technique, comprising (i) providing a sample for correction wherein the mixing ratio of specimen derived from specified genus plant as a detection target and standard plant specimen is identified in advance and extracting genomic DNAs from the sample; (ii) preparing a test sample by adding a known amount of standard plant specimen to food or food raw material as a test subject and extracting genomic DNAs from the sample; (iii) carrying out quantitative PCR with the use of primers and these genomic DNAs; and (iv) while effecting correction with the use of correction standard value detected in the sample for correction, calculating the amount of specified plant raw material contained in the test sample.

(57) 要約:

P C R 法による食品または食品原材料中の特定植物属を定量する方法であって、(i)検出対象である特定植物属由来の試料と標準植物試料との混合比が予め判っている補正用サンプルを用意し、該サンプルからゲノム D N A を抽出すること、(ii)被検対象とする食品または食品原材料に既知量の標準植物試料を添加した被検サンプルを調製し、該サンプルからゲノム D N A を抽出すること、(iii)該ゲノム D N A とプライマーとで定量的 P C R 法を実施すること、(iv)補正用サンプルで検出される補正標準値を用いて補正して、被検サンプル中に含まれる特定植物原料の量を算出することを含む上記方法が提供される。

WO 2004/101794 A1



DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

## 食品または食品原材料中の特定植物属の定量的 PCR 検出法

## 技術分野

本発明は、食品または食品原材料中に含まれる特定植物属の定量的検出方法に関する。

## 背景技術

2002 年 4 月より、日本において、アレルギーの原因となる特定原材料について製品への表示制度が開始された。したがって、食品については特定原材料として、小麦、ソバ、落花生、乳および卵の 5 品目について下記の条件に沿って表示が義務づけられた [(「厚生労働省ホームページ：アレルギー物質を含む食品に関する表示について」(<http://www.mhlw.go.jp/topics/0103/tp0329-2b.html>))、(「食品衛生学雑誌 (Journal of the Food Hygienics Society of Japan (SHOKUHIN EISEIGAKU ZASSHI))」, (日本), 社団法人 日本食品衛生学会, 2002 年, 第 43 巻, 第 4 号, p. j - 269 - j - 271)]。これに伴い、厚生労働省からは、特定原材料について、一次スクリーニング用のポリクローナル抗体による定量 ELISA 法ならびに確定試験用の定性 PCR 法(小麦、ソバ、落花生) およびウェスタンブロット法(乳、卵)の試験が通知されている。一次スクリーニングの ELISA 法については 2 種の ELISA キットのうちのいずれかの定量値が 10ppm 以上(特定原材料の総タンパク質量/最終製品重量に換算)である試料は陽性であると判断され、さらに、製造記録の確認、PCR 法(小麦、ソバ、落花生)またはウェスタンブロット法(乳、卵)による定性試験での確認が行われることになる [(「厚生労働省ホームページ：「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」(食発第 1106001 号) ([http://www.hourei.mhlw.go.jp/hourei/cgi-bin/t\\_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=4642](http://www.hourei.mhlw.go.jp/hourei/cgi-bin/t_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=4642))))]。

一般に、ELISA 法は非常に高感度のタンパク質検出法であり、当該方法は当技術分野においては慣用技術となっている。しかしながら、ポリクローナル抗体を用いた ELISA 法では交差反応性が比較的高く、非特異的なタンパク質を検出する可能性があるため(石川栄治監訳：エンザイムイムノアッセイ (1989))、偽陽性の判定が出る可能性がある。

偽陽性について検定するためには、他の方法で再確認することを要する。

また、ELISA 法は、高感度である一方で、測定におけるダイナミックレンジが狭い。測定におけるダイナミックレンジが狭いということは、未知の濃度の試料を正確に測定するためには、何段階かに希釈した検液を用意して、検量線の範囲内に収まる検液の測定結果を選択する必要がある可能性がある。さらに、通常 ELISA による測定では、被検対象とする試料毎の抽出効率や ELISA 反応の阻害などの影響に対する補正が考慮されておらず、特に食品のような多岐に渡る加工処理および混入物が推定される試料等を測定して定量値を出す場合には注意が必要である。

さらに、例えば、市販のソバタンパク質検出用 ELISA の検出感度は、キット付属の検量線用標準ソバタンパク質検液で  $\text{ng/ml}$  (20~400 倍希釈して ELISA に供したとすると、特定原材料の総タンパク質量/最終製品重量に換算すると 0.02~0.1ppm) と高感度である [(「食品衛生学雑誌 (Joournal of the Food Hygienics Society of Japan (SHOKUHHIN EISEIGAKU ZASSHI))」, (日本), 社団法人 日本食品衛生学会, 2002 年, 第 43 巻, 第 4 号, p. j - 275 - j - 277]、(「食品衛生学雑誌 (Joournal of the Food Hygienics Society of Japan (SHOKUHHIN EISEIGAKU ZASSHI))」, (日本), 社団法人 日本食品衛生学会, 2002 年, 第 43 巻, 第 4 号, p. j - 277 - j - 279]、(日本ハム株式会社 FAST KIT (Food Allergen Screening Test) シリーズ エライザ そば-ELISA BUCKWHEAT -<<取扱説明書>>)、(株式会社森永生科学研究所 モリナガ そば 測定キット 取扱説明書)]。しかしながら、例えばソバの総タンパク質量/試料重量に換算してこのレベルの濃度となるソバ粉を含む試料から 2g をサンプリングした場合、検出対象の特定原材料の粒径がかなり細かくないと、試料からはソバ粉の粒をサンプリングできない恐れもあり得る。

一方、混入したソバを検出するための PCR 法として現在知られているものは、感度がソバ DNA 量として約 5pg であり、小麦中にソバを添加した試料では約 10ppm のソバが検出できるが、この公知の方法では定量分析はできない [(「食品衛生学雑誌 (Journal of the Food Hygienics Society of Japan (SHOKUHHIN EISEIGAKU ZASSHI))」, (日本), 社団法人 日本食品衛生学会, 2002 年, 第 43 巻, 第 4 号, p. j - 280 - j - 282]、(「(社) 日本食品衛生学会第 84 回学術講演会 講演要旨集」, (日本), 社団法人 日本食品衛生学会, 2002 年, p. 104))。



また、本発明者らは、特定植物属の存在を検出するための方法として、1ppm 以上 (DNA /DNA) の感度で検出可能な ITS 配列を標的とした定性 PCR 法を開発し、2002年9月27日付けで日本国特許出願 (出願番号：特 2002-284222) をしたが、当該方法では定量分析はできない。

遺伝子組換え作物の PCR による定量法として、遺伝子組換えとうもろこしに特有の遺伝子配列のコピー数を測定し、別途測定したとうもろこしに固有の内在性遺伝子配列のコピー数で補正を行い、とうもろこし原料中の遺伝子組換えとうもろこし原料の量を測定するものがある [(「ジャーナル オブ エーオーエーシー インターナショナル (Journal of AOAC INTERNATIONAL)」, (米国), エーオーエーシー インターナショナル (AOAC INTERNATIONAL), 2002年, 第85巻, 第5号, p. 1077-1089)]。

詳しくは、まず純粋な遺伝子組換えとうもろこしの代表的な品種を使用して、その種子から抽出した DNA の「組換え DNA 配列のコピー数/内在性遺伝子配列のコピー数」の値 (内標比) を求める。次に、未知試料の「組換え DNA 配列のコピー数/内在性遺伝子配列のコピー数」の値を求め、これに内標比の逆数と 100 を乗じて遺伝子組換えとうもろこしの混入率を測定するものである。この方法では、種々の品種のとうもろこしでコピー数が同じであり、かつ共通な塩基配列を持つ内在性遺伝子を内部標準として用いているため、とうもろこしならとうもろこしというように同じ植物種からなる試料中での組換え体の含有量を定量することには適している。

しかしながら、様々な生物種や無生物の原料からなる混合物中に存在するアレルギーの原因となる特定原材料の量を測定することを考えた場合、様々な生物種の DNA の中から内部標準として用いることのできる内在性配列を見出すことは困難であり、さらには無生物の様に DNA の無いものからそれを見出すことは不可能である。

#### 発明の開示

そこで、食品または食品原材料中に混入した特定の原材料の定量的検出方法として、より欠点の少ない方法を開発することを試みた。すなわち、被検対象とする試料毎の抽出効率や検出反応の阻害などの影響に対する補正が可能であり、ELISA 法よりダイナミックレンジが広く、かつ食品または食品原材料中に混入した特定の原材料の定量的検出に十分な特異性および感度を有する定量方法の開発を目的として、本発明を検討した。

すなわち、被検対象とする試料毎の抽出効率や検出反応の阻害などの影響を考慮するために標準植物由来の試料（標準植物試料）を用いて補正すること、検出のダイナミックレンジが公知の ELISA 法に比べて広いこと、ならびに十分な特異性および感度を有することを特徴とする、定量的 PCR 検出法の確立を鋭意検討し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は、

1. PCR 法による食品または食品原材料中の特定植物属に属する植物を定量する方法であって、

検出対象である特定植物属由来の試料と標準植物試料とを予め定めた比率で混合した補正用サンプルを用意し、該サンプルからゲノム DNA を抽出すること、

被検対象である食品または食品原材料に既知量の標準植物試料を添加した被検サンプルを調製し、該サンプルからゲノム DNA を抽出すること、

検出対象である特定植物属由来の試料を検出するためのプライマーセット、および標準植物試料を検出するためのプライマーセットを用いて各サンプルから抽出したゲノム DNA をテンプレートとして定量的 PCR 法を実施すること、

補正標準値として、補正用サンプルについて上記定量的 PCR 法によって標準植物由来 DNA のコピー数／特定植物属由来 DNA のコピー数の値を求めること、ならびに

被検サンプルについて上記定量的 PCR 法によって特定植物属由来 DNA のコピー数／標準植物由来 DNA のコピー数の値を求め、これを上記補正標準値を用いて補正して、食品または食品原材料中に含まれる特定植物属の植物の量を算出すること、を含む上記方法；

2. 定量的 PCR 法がリアルタイム PCR 法である、上記 1 記載の方法；

3. リアルタイム PCR 法が、5' 末端に発光色素および 3' 末端に消光剤を有している、PCR プライマーセットの各オリゴヌクレオチドがハイブリダイズするゲノム DNA の部位の内側にハイブリダイズするプローブを用いて、発光量に基づいて DNA を定量する方法であって、ここで、プローブの 5' 末端の発光色素はその 3' 末端の消光剤によってその発光が抑制されているが、PCR 反応において Taq ポリメラーゼによってプライマーから DNA が伸長されると、Taq ポリメラーゼの 5'→3' エキソヌクレアーゼ活性により上記プローブが分解され、発光色素と消光剤とが解離して発光を生じることを特徴とする、

上記 2 記載の方法；

4. 標準植物が、畑地雑草および食用作物以外の植物種に属するものである、上記 1 ～ 3 のいずれかに記載の方法；

5. 標準植物が、スターチスである上記 4 記載の方法；

6. 検出対象の特定植物属が、ソバ、落花生、小麦または大豆属である、上記 1 ～ 5 のいずれかに記載の方法；

7. 標準植物がスターチスであり、スターチス検出用プライマーセットが、配列番号 5 7 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号 5 8 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドとからなるセットであり、スターチス検出用プローブが、配列番号 5 9 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドである、上記 2 または 3 記載の方法；

8. 検出対象の特定植物属がソバ属であり、ソバ属検出用プライマーセットが、配列番号 1 4 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号 1 5 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドとからなるセットであり、ソバ属検出用プローブが、配列番号 6 4 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドである、上記 2 または 3 記載の方法；

9. 検出対象の特定植物属が落花生属であり、落花生属検出用プライマーセットが、配列番号 2 1 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号 2 6、6 5 または 6 6 記載のいずれかの配列を有するオリゴヌクレオチドとからなるプライマーセットであり、落花生属検出用プローブが、配列番号 3 4 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドである、上記 2 または 3 記載の方法；

10. 配列番号 5 7 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号 5 8 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドとからなるスターチス検出用プライマーセット；

11. 配列番号 1 4 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号 1 5 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドとからなるソバ属検出用プライマーセット。

12. 配列番号 2 1 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号 2 6、6 5 または 6 6 記載のいずれかの配列を有するオリゴヌクレオチドとからなる落花生属検出用プライマーセット；

13. 食品または食品原材料中の特定植物属に属する植物を検出するための方法に用いるためのキットであって、標準植物試料検出用プライマーセットを含む、上記キット；

14. 標準植物試料検出用プローブをさらに含む、上記13記載のキット；
15. 標準植物がスターチスであり、スターチス検出用プライマーセットが、配列番号57記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号58記載の配列を有するオリゴヌクレオチドとからなるセットである、上記13または14記載のキット；
16. 配列番号59からなる配列を有する、スターチス検出用プローブをさらに含む、上記15記載のキット；
17. 検出対象の特定植物属検出用プライマーセットをさらに含む、上記13～16のいずれかに記載のキット；
18. 検出対象の特定植物属がソバ属であり、その検出用プライマーセットが、配列番号14記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号15記載の配列を有するオリゴヌクレオチドとからなるセットである、上記13～16のいずれかに記載のキット；
19. 配列番号64からなる配列を有するソバ属検出用プローブをさらに含む、上記18記載のキット；
20. 検出対象の特定植物属が落花生属であり、その検出用プライマーセットが、配列番号21記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号26、65または66記載の配列を有するオリゴヌクレオチドとからなるセットである、上記13～16のいずれかに記載のキット；
21. 配列番号34からなる配列を有する落花生属検出用プローブをさらに含む、上記20記載のキット；
22. 標準植物試料としてスターチス試料をさらに含む、上記15記載のキット；
23. 標準植物がスターチスであり、かつ、検出対象の特定植物属がソバ属であり、スターチスおよびソバについての検量線を作製するための、スターチスの増幅標的配列を含むDNAとソバの増幅標的配列を含むDNAとを連結して含む検量線作製用プラスミドをさらに含む、上記13記載のキット；
24. 標準植物がスターチスであり、かつ、検出対象の特定植物属が落花生属であり、スターチスおよび落花生についての検量線を作製するための、スターチスの増幅標的配列を含むDNAと落花生の増幅標的配列を含むDNAとを連結して含む検量線作製用プラスミドをさらに含む、上記13記載のキット；

25. 食品または食品原材料中のソバ属に属する植物を検出するための方法に用いるためのキットであって、配列番号14記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号15記載の配列を有するオリゴヌクレオチドとからなるソバ属検出用プライマーセットを含む、上記キット；

26. 配列番号64からなる配列を有するソバ属検出用プローブをさらに含む、上記25記載のキット；

27. 食品または食品原材料中の落花生属に属する植物を検出するための方法に用いるためのキットであって、配列番号21記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号26、65または66記載の配列を有するオリゴヌクレオチドとからなる落花生属検出用プライマーセットを含む、上記キット；ならびに

28. 配列番号34からなる配列を有する落花生属検出用プローブをさらに含む、上記27記載のキット；  
に関する。

本発明の方法、すなわち、被検対象とする試料毎のDNA抽出効率やPCR反応の阻害などの影響に対する補正の方法として、外部からDNAを標準として添加して反応溶液中のPCR反応の阻害などの影響に対する補正を行うのではなく、外部から精製DNA以外の標準植物試料を添加したサンプルから検出対象の特定植物属（本明細書中、「検出対象の特定植物属」とは、定量対象の特定植物属をも包含する）由来のDNAと標準植物由来のDNAを同時に抽出して定量的PCR法を行うという方法は、本明細書において初めて開示されるものである。かかる方法により、標準植物試料と検出対象の特定植物属由来の試料との間で、DNA抽出効率やPCR反応の阻害等の影響が均一な条件で測定できるため、非常に信頼度の高い定量が可能である。また、DNA抽出効率、PCR反応の阻害等の影響、さらには被検対象とする試料中のDNA含有量の違いに対しても補正が可能であるという、有利な効果を本発明の方法は有している。さらに、PCR法による定量分析は、偽陽性が出た場合に、そのPCR増幅産物をDNA配列の解析に供することにより、確実に偽陽性を除外することができるという点から、産業上利用性に優れているといえる。したがって、本発明は、食品または食品原材料中に含まれるアレルギーの原因となる特定植物属に属する植物の定量的検出に有用である。

したがって、本発明の方法において、標準植物試料として用いるスターチス検出用プ

ライマーセット、および特定植物属としてのソバ属または落花生属検出用のプライマーセットも本発明に包含し、さらに、これらのプライマーセットと組合わせて、リアルタイム PCR 法による検出に用いるためのプローブも本発明に包含される。また、標準植物試料を検出するためのプライマーセット、および検出対象の特定植物属に属する植物を検出するためのプライマーセットのいずれかまたは両方を含む、本発明の方法の実施に用いるためのキットも本発明の範囲に含まれる。かかるキットは、上記プローブを含んでいてもよい。さらには、標準植物試料を含んでいてもよく、標準植物としてはスターチスが好ましく、その試料としてはスターチス植物体の乾燥粉末が好ましいが、特に種子の乾燥粉末が好ましい。さらには、該キットに含まれるプライマーセットが増幅し得る、標準植物試料の配列を含む DNA と検出対象の特定植物属の配列を含む DNA とを連結して含む、標準植物試料と特定植物属についての検量線を作成するための検量線作成用プラスミドが、上記キットに含まれていてもよい。

本明細書において、所定の植物もしくは植物属（その属に属する、即ち含まれる植物を指す場合も含む）、またはこれらに由来する試料の「検出用プライマー」または「検出するためのプライマー」とは、PCR 法において、所定の植物または植物属に属する植物のゲノム DNA の一部を特異的に増幅するためのオリゴヌクレオチドからなるプライマーをいう。PCR 法に用いるためのフォワードプライマーとリバースプライマーの 2 つのオリゴヌクレオチドからなるプライマー対を、本明細書においては「プライマーセット」と称する場合がある。

本発明のプライマーは、各植物属を定量するための定量的 PCR 法に用いることができるものであるが、各植物属の非定量的（即ち、定性）検出に用いることもできるものであることは言うまでもない。本発明のプライマーを用いると、検出対象とする植物属に属するあらゆる植物種を検出することができ、本発明のプライマーおよびプライマーセットは、定量的および非定量的 PCR において有利である。

本明細書中、「検出」という用語は、定性および定量的検出の両方を包含する。

本発明においては、検出対象である特定植物属由来の DNA を特異的に増幅させるためのプライマーを設計する。すなわち、45S rRNA 前駆体遺伝子配列中で特定植物属に共通する塩基配列を有する核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るプライマーであって、該核酸分子とハイブリダイズしたときに 3' 末端が特定植物属の

ITS-1 配列中の塩基と相補的に結合するプライマー（A）または ITS-2 配列中の塩基と相補的に結合するプライマー（B）を 1 種以上使用した PCR の後、特定植物属の ITS-1 または ITS-2 配列の少なくとも一部を含む PCR 増幅産物の存在を指標として特定植物属の存在を検出することができるプライマーを設計する。

なお、「ストリンジントな条件下でハイブリダイズする」とは、2 つの DNA 断片が、Sambrook J らによって記載されたような標準的なハイブリダイゼーション条件下で相互にハイブリダイズすることを意味する（Expression of cloned genes in *E. coli* (Molecular Cloning: A laboratory manual (1989)) Cold Spring harbor Laboratory Press, New York, USA, 9. 47-9. 62 及び 11. 45-11. 61)。より具体的には、例えば以下の式で求められる  $T_m$  値を基準としてハイブリダイゼーション（例えば約  $3.0 \times \text{SSC}$  または  $2.0 \times \text{SSC}$ 、 $30^\circ\text{C}$  または  $37^\circ\text{C}$ ）を行った後、ハイブリダイゼーションの条件よりストリンジエンシーの高い条件での洗浄（例えば約  $2.0 \times \text{SSC}$ 、 $30^\circ\text{C}$ 、 $37^\circ\text{C}$ 、 $40^\circ\text{C}$ 、 $44^\circ\text{C}$  もしくは  $48^\circ\text{C}$  以上、または  $1.0 \times \text{SSC}$  もしくは  $0.5 \times \text{SSC}$ 、 $37^\circ\text{C}$  以上など）を行うことを意味する。ハイブリダイズする塩基配列などに応じて適宜ハイブリダイゼーションおよび洗浄に適切な「ストリンジントな条件」を選択することは、当技術分野では周知技術である。なお、本明細書中、単に「ハイブリダイズする」と記載する場合も、特に条件等を言及しているものを除き、ストリンジントな条件下でハイブリダイズすることを意味する。

$$T_m = 81.5 + 16.6 (\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41 (\text{fraction G+C}) - (600/N)$$

また、本明細書でいう「属」とは、その属に属する植物全部を含むもの、または属に属する植物の中から選んだ幾つかの種を含むものを意味する。

本発明に用いるプライマーセットは、45S rRNA 前駆体遺伝子配列中の、特定植物属内で共通している塩基配列を有する核酸分子とストリンジントな条件下でハイブリダイズし得るプライマー対であって、該プライマー対のうち少なくとも一方のプライマーは、該核酸分子とハイブリダイズしたときに 3' 末端が特定植物属の ITS-1 配列中の塩基と相補的に結合するプライマー（A）または ITS-2 配列中の塩基と相補的に結合するプライマー（B）であることが重要である。ここで、プライマー（A）は ITS-1 と 5.8S rRNA 遺伝子配列との境界を含む領域にハイブリダイズするもの及び ITS-1 と SSU rRNA 遺伝子配列との境界を含む領域にハイブリダイズするものをも含む。同様に、プライマー（B）

は ITS-2 と 5.8S rRNA 遺伝子配列との境界を含む領域にハイブリダイズするもの及び ITS-2 と LSU rRNA 遺伝子配列との境界を含む領域にハイブリダイズするものをも含む。プライマー (A) 及び (B) は少なくとも 15 個の塩基からなるものが好ましく、より好ましくは 15 から 30 個の塩基からなる。ITS-1 配列及び ITS-2 配列は種に特異的な配列を多く含んでいるので、45S rRNA 前駆体遺伝子配列中の、特定植物属内で共通している塩基配列を有する核酸分子として、ITS-1 または ITS-2 配列中の、特定植物属内で共通し、かつ該属に特異的な塩基配列を有する核酸分子を好適に選択することにより、特定種類の植物属内で共通し、かつ該属に特異性を持つプライマー (A) または (B) を得ることができる。また、プライマー (A) または (B) を 1 個または 2 個以上使用してもよく、2 個以上使用する場合には、さらに特定種類の植物属に対する特異性が高くなる。

また、別の態様としては、プライマー (A) と、特定植物属の ITS-1、5.8S rRNA 遺伝子、ITS-2 及び LSU rRNA 遺伝子が連続して結合した配列の一部の塩基配列を有する核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るプライマー (C) とを使用する。あるいはプライマー (A) と、特定植物属の SSU rRNA 遺伝子及び ITS-1 が連続して結合した配列の一部の塩基配列を有する核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るプライマー (E) とを使用する。さらに、別の態様としては、プライマー (B) と、特定植物属の SSU rRNA 遺伝子、ITS-1、5.8S rRNA 遺伝子及び ITS-2 が連続して結合した配列の一部の塩基配列を有する核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るプライマー (D) とを使用する。あるいはプライマー (B) と、特定植物属の ITS-2 及び LSU rRNA 遺伝子に連続して結合した配列の一部の塩基配列を有する核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るプライマー (F) とを使用する。ここで、5.8S rRNA 遺伝子は保存性が高く、大多数の植物に共通な配列を多く含んでいる。それ故、プライマー (C) として、5.8S rRNA 遺伝子の一部の塩基配列を有する核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るプライマーであって、該核酸分子とハイブリダイズしたときに 3' 末端が 5.8S rRNA 遺伝子配列中の塩基配列と相補的に結合するプライマーを好適に選択することにより、またはプライマー (D) として、5.8S rRNA 遺伝子の一部の塩基配列を有する核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るプライマーであって、該核酸分子とハイブリダイズ



したときに 3' 末端が 5.8S rRNA 遺伝子配列中の塩基配列と相補的に結合するプライマーを好適に選択することにより、該プライマーは種々の植物に対して共通して使用することも可能である。これらのプライマーを固定し、ITS-1 または ITS-2 領域から検出した特定植物属内で共通し、かつ該属に特異的なプライマーを選択することによって、該特定植物属に属する植物の混入を高感度で検出するためのプライマーを容易に設計することができる。プライマー (C) ~ (F) は少なくとも 15 個の塩基からなるものが好ましく、より好ましくは 15 から 30 個の塩基からなる。

これらプライマーを設計するに当たっては、例えば「PCR 法最前線—基礎技術から応用まで」(タンパク質・核酸・酵素 臨時増刊号 1996 年 共立出版株式会社)や「バイオ実験イラストレイテッド 3 本当に増える PCR:細胞工学別紙 目で見える実験ノートシリーズ」(中山広樹著 1996 年 株式会社秀潤社)、「PCR テクノロジー—DNA 増幅の原理と応用—」(Henry A Erlich 編、加藤邦之進監修 宝酒造株式会社)等に基づいて設計すればよいが、未加工品からの検出の場合には、DNA が分解している可能性が少ないので、700 塩基以内の増幅産物を得ることができるプライマーであってもよく、加工食品からの検出の場合には、DNA が分解して短くなっている可能性が考えられ、このような観点から 200 塩基以内の増幅産物を得ることができるプライマーが高い感度を得ることができるという点から好ましい。

上述の観点から、プライマー (C) または (D) は配列番号 1 で表される塩基配列またはその相補鎖の塩基配列を有する核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るプライマーであることが好ましい。5.8S rRNA 遺伝子配列は、ほぼ全域にわたって植物間で相同性が高いため、どこの領域にハイブリダイズするプライマーであっても使用することができるが、配列番号 1 は特に高い相同性を有する領域であるため、前記プライマーが好ましい。さらに好ましくは、配列番号 1 の位置 11~63 の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列を有する核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るプライマーである。このようなプライマー (C) としては、配列番号 2~4 で表されるオリゴヌクレオチドが好ましい(配列番号 1 にハイブリダイズする)。また、このようなプライマー (D) としては、配列番号 5~7 で表されるオリゴヌクレオチドが好ましい(配列番号 1 の相補鎖にハイブリダイズする)。前記プライマーは、標的とする核酸分子と特異的にストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることが必要であ

り、またハイブリダイズしたプライマーがプライマーとして機能し、伸長反応が起きるには 3' 末端の塩基が標的とする DNA 配列部分と相補的な塩基となっている必要がある。従って、このような要件を満たしていれば、前記プライマーは、配列番号 2～7 で表される塩基配列の 1 個または数個の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドであってもよい。

ITS-1 や ITS-2 配列中の、特定植物属内で共通し、かつ該属に特異的な塩基配列は、検出対象である特定植物属および他の植物属の種々の植物の ITS-1～5.8S rRNA 遺伝子～ITS-2 配列を GenBank から取得し、アライメントを行い、該特定植物属に共通し、かつ該属に特異性の高い領域を探すことによって特定することができる。さらに、この特定した領域の中から、特に該特定植物属とその近縁種と考えられる植物との特異性が確保できる塩基を 3' 末端の塩基に設定して、プライマー配列を選定することができる。

例えば、特定植物属がソバ属の場合、ソバ属の ITS-1 配列中の、ソバ属内で共通し、かつ該属に特異的な塩基配列としては、市販ソバの大多数が *Fagopyrum esculentum* (普通ソバ) であることや実際の市販ソバの配列が GenBank の *Fagopyrum esculentum* (普通ソバ) 配列と合致したことにより、*F. esculentum* の配列から選択すればよく、具体的には、配列番号 8、9 または 10 で表される塩基配列あるいはそれらの相補鎖の塩基配列を挙げることができる。好ましくは、配列番号 8 の位置 11～61 の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列、配列番号 9 の位置 11～67 の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列を挙げることができる。また、配列番号 10 は、特にソバ属の一部である *F. esculentum* (普通ソバ)、*F. tataricum* (ダツタンソバ)、*F. homotropicum*、*F. cymosum* を特異的に検出したいプライマーを選ぶ領域として有用である。

ソバ属のプライマー (A) としては、配列番号 11～16 で表されるオリゴヌクレオチドが好ましい (配列番号 11～14 は配列番号 8 の相補鎖に、配列番号 15 及び 16 は配列番号 9 に、それぞれストリンジェントな条件でハイブリダイズする)。また、前記プライマーは配列番号 11～16 で表される塩基配列の 1 個または数個の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドであってもよい。また、ITS-2 配列中で、ソバ属に共通し、かつ該属に特異的な塩基配列としては、配列番号 36 または 37 で表される塩基配列あるいはそれらの相補鎖の塩基配列を挙げることができる。これらは、特にソバ属の一部である *F. esculentum* (普通ソバ)、*F. tataricum* (だ

ったんソバ)、*F. homotropicum*、*F. cymosum* を特異的に検出したい際のプライマーを選ぶ領域として有用である。そして、プライマーの組み合わせとしては、配列番号 11～14 のいずれかと、配列番号 15、16 または配列番号 2～4 とのいずれかとの組み合わせが好ましい。

特定植物属が落花生属の場合、市販落花生の大多数が *Arachis hypogaea* であるが、実際の市販落花生の配列が GenBank の *A. correntina*、*A. villosa* の配列と合致したことにより、落花生属の ITS-1 配列中の、落花生属内で共通し、かつ該属に特異的な塩基配列としては、*A. villosa* の配列から選択すればよく、具体的には、配列番号 17～20 で表される塩基配列またはそれらの相補鎖の塩基配列を挙げることができる。好ましくは、配列番号 17 の位置 11～62 の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列、配列番号 18 の位置 11～47 の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列、配列番号 19 の位置 11～50 の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列、配列番号 20 の位置 11～58 の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列である。

落花生属のプライマー (A) としては、配列番号 21～31、65 および 66 で表されるオリゴヌクレオチドが好ましい (配列番号 21～23 は配列番号 17 の相補鎖に、配列番号 24 および 25 は配列番号 18 の相補鎖に、配列番号 30 および 31 は配列番号 20 の相補鎖に、配列番号 26～29、65 および 66 は配列番号 19 に、それぞれストリンジェントな条件でハイブリダイズする)。また、前記プライマーは、上記のとおりそれぞれの相手側の配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであれば、配列番号 21～31、65 および 66 で表される塩基配列のうちの 1 個または数個の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列を有するものであってもよい。また、落花生属の ITS-2 配列中の、落花生属内で共通し、かつ該属に特異的な塩基配列としては、配列番号 38 で表される塩基配列あるいはそれらの相補鎖の塩基配列を挙げることができる。好ましくは、配列番号 38 の位置 11～47 の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列である。さらに、落花生属のプライマー (B) としては、配列番号 39 で表されるオリゴヌクレオチドが好ましい (配列番号 38 にストリンジェントな条件でハイブリダイズする)。また、前記プライマーは配列番号 39 で表される塩基配列の 1 個または数個の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドであってもよい。そして、プライマーの組み合わせとしては、配列番号 21、24

または 2 5 と配列番号 2 ～ 4 のいずれかとの組み合わせ、配列番号 2 1、2 4 または 2 5 と配列番号 3 9 との組み合わせ、または配列番号 3 9 と配列番号 5 ～ 7 のいずれかとの組み合わせ、または配列番号 2 1 ～ 2 3、3 0 および 3 1 のいずれかと配列番号 2 6 ～ 2 9、6 5 および 6 6 のいずれかとの組み合わせが好ましいが、配列番号 2 1、2 4、および 2 5 のいずれかと配列番号 2 ～ 4 のいずれかとの組み合わせ、または、配列番号 2 1 と配列番号 2 6、6 5 および 6 6 のいずれかとの組み合わせがより好ましい。

特定植物属が小麦属の場合、小麦属の ITS-2 配列中の、小麦属内で共通し、かつ該属に特異的な塩基配列として、配列番号 4 0 ～ 4 2 で表される塩基配列あるいはそれらの相補鎖の塩基配列を挙げることができる。好ましくは、配列番号 4 0 の位置 11～50 の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列、配列番号 4 1 の位置 11～47 の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列、配列番号 4 2 の位置 11～47 の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列である。

小麦属のプライマー (B) としては、配列番号 4 3 ～ 4 5 で表されるオリゴヌクレオチドが好ましい (配列番号 4 3 は配列番号 4 0 の相補鎖に、配列番号 4 4 は配列番号 4 1 に、配列番号 4 5 は配列番号 4 2 に、それぞれストリンジェントな条件でハイブリダイズする)。また、前記プライマーは配列番号 4 3 ～ 4 5 で表される塩基配列の 1 個または数個の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドであってもよい。そして、プライマーの組み合わせとしては、配列番号 4 3 と配列番号 4 4 および 4 5 の 1 個以上との組み合わせが好ましい。

特定植物属が大豆属の場合、大豆属の ITS-2 配列中の、大豆属内で共通し、かつ該属に特異的な塩基配列として、配列番号 4 6、4 7 または 4 8 で表される塩基配列あるいはそれらの相補鎖の塩基配列を挙げることができる。好ましくは、配列番号 4 6 の位置 11～48 の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列、配列番号 4 7 の位置 11～55 の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列、配列番号 4 8 の位置 11～52 の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列である。

大豆属のプライマー (B) としては、配列番号 4 9 ～ 5 6 で表されるオリゴヌクレオチドが好ましい (配列番号 4 9 は配列番号 4 6 の相補鎖に、配列番号 5 0 ～ 6 5 は配列番号 4 7 に、配列番号 5 6 は配列番号 4 8 に、それぞれストリンジェントな条件でハイブリダイズする)。また、前記プライマーは配列番号 4 9 ～ 5 6 で表される塩基配列の 1

個または数個の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドであってもよい。そして、プライマーの組み合わせとしては、配列番号 49 と配列番号 50～56 の 1 個以上との組み合わせが好ましい。

これらプライマーの設計や、設計したプライマーの評価にあたっては、PCR シミュレーションを利用しても良い。

例えば、ソバ属を検出するプライマーの設計においては、食用ソバ（普通ソバ、ダツタンソバ）を含むソバ属の植物 21 配列に共通かつ特異性の高い領域を ITS-1～5.8S rRNA 遺伝子～ITS-2 配列部分から見出し、さらに他の植物との特異性が確保できる塩基を 3' 末端の塩基に設定して配列を選定する。ただし、ソバ属の場合 ITS-1～5.8S rRNA 遺伝子～ITS-2 配列部分においては、種ごとに塩基の欠落部分や欠落塩基数に違いがあるため、ソバ属の植物 21 配列すべてから同じサイズの増幅産物を得るためには、さらに選別する必要がある。同じサイズの増幅産物を得ることができれば、容易にソバ属の存在を検出することができる。ソバ属では、特にプライマー（A）とプライマー（C）、または 2 個のプライマー（A）を選定することによって、ソバ属の植物 21 配列すべてから同じサイズの増幅産物を得ることがシミュレーションで確認できる。これにより、サイズによって非特異産物との識別が容易にできるプライマーを設計することができる。

本発明においては、上記プライマーを用いて、PCR 法により検出対象である特定植物属に属する植物を検出する。または、定量的 PCR 法により該植物を定量する。

PCR に当たっては、例えば Saiki RK, et al., Science, 230 : 1350-1354 (1985) や植物細胞工学別冊、植物の PCR 実験プロトコル、島本功・佐々木卓治監修（1995 年）等に記載されている通常の方法に基づき、変性、アニーリング、伸長の各ステップの温度と時間、酵素（DNA ポリメラーゼ）の種類と濃度、dNTP 濃度、プライマー濃度、塩化マグネシウム濃度、鋳型 DNA 量等の条件を適宜、変更し最良のものを選択する。

また、PCR 増幅で使用するプライマーとテンプレート DNA のアニーリング温度を、HYB Simulator<sup>TM</sup> version 4.0 (Advanced Gene Computing Technologies, Inc.) や Primer Express<sup>TM</sup> version 1.5 (Applied Biosystems 社) 等の市販ソフトで算出した該プライマーの T<sub>m</sub> 値よりも高い温度、好ましくは T<sub>m</sub> 値+10～+3℃に設定して PCR 増幅を行い、次いでアニーリング温度を該プライマーの T<sub>m</sub> 値近傍、好ましくは T<sub>m</sub> 値+7～±0℃の温度に設定して PCR 増幅を行うこともできる。

定量的 PCR 法としては、リアルタイム PCR 法を用いる定量方法が好ましい。リアルタイム PCR 法としては、サイバーグリーン (SYBR Green) 法、TaqMan (商標) プローブ法などの蛍光プローブ (Fluorogenic probe) 法、モレキュラービーコン (Molecular Beacon) 法、および LightCycler (商標) プローブ法などが挙げられるが、これらに限定はされない。種々の方法が最近精力的に開発されており、当業者であれば、任意の方法を実施することができる。この場合のプローブの設計に当たっては、増幅標的配列に対する PCR プライマーがハイブリダイズする部位の内側に、ストリンジেন্টな条件でハイブリダイズし得る配列から選択する。

特に、上記の通り設計された特定植物特異的なプライマーセットと、5' 末端に発光色素および 3' 末端に消光剤を有している、増幅標的配列に対する PCR プライマーセットの各オリゴヌクレオチドがハイブリダイズする部位の内側に、ストリンジেন্টな条件でハイブリダイズするプローブとを用いて発光量に基づいて DNA を定量する方法であって、該プローブの 5' 末端の発光色素は 3' 末端の消光剤によってその発光が抑制されているが、PCR 反応において Taq ポリメラーゼによってプライマーから DNA が伸長されると、Taq ポリメラーゼの 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性により上記プローブが分解され、発光色素と消光剤とが解離して発光を生じることを特徴とする方法が好ましい。また、プローブ配列全体が上記 PCR プライマーがハイブリダイズする部位の内側に存在する必要はなく、設計したプローブの 3' 末端側の塩基とプローブがハイブリダイズする鎖の逆鎖に設計したプライマーの 3' 末端側の塩基とが 1~10、または 1~5 塩基重複していてもよい。また、プローブ配列は、検出対象である特定植物属に共通な配列を有する部分から選択することがより好ましい。上記プローブには、TaqMan プローブ (商標) が好ましい。TaqMan プローブの設計方法は、当技術分野では公知である (Applied Biosystems 社の PrimerExpress ソフトウェア 簡易操作ガイド PrimerExpress ソフトウェア TaqMan プローブ検索のための簡易操作ガイド : Rev. C (<http://www.appliedbiosystems.co.jp/website/jp/product/ctlgpage.jsp?MODELCD=19775&PLCD=17689&BUCD=131> などを参照のこと)。本明細書中においては、所定の植物または植物属の植物の定量的 PCR に用いることができるプローブを、所定の植物または植物属の植物の「検出用プローブ」と称する。即ち、本明細書中、検出用プローブとは、各植物属に対する検出用プライマーセットと組合わせて、該プローブを用いることによ

り、該植物属に属する植物を検出することができるプローブを指す。ここで、検出とは、前述の通り定性および定量的検出の両方を包含し、かかるプローブは、定量的検出にも有利であることは当然理解されるであろう。

該プローブに用いる発光色素としては、FAM、HEX、TET および FITC などが知られているが、これらに限定はされない。また、消光剤としては TAMRA、Dabcyl など、および非蛍光性消光剤も知られているが、やはり、これらに限定はされない。

上記プローブの長さとしては、13～30 塩基長が好ましく、特に 13～25 塩基長が好ましい。また、短い塩基長でも  $T_m$  値が高く維持できるように、3' 末端の消光剤にさらに、MGB (Minor Groove Binden) を標識したプローブを使用することが、より好ましい。具体的には、ソバ属の場合のプローブとしては配列番号 6 4 で表わされるオリゴヌクレオチドを例示することができる。落花生属のプローブとしては、プライマーに配列番号 2 4 と 2 5 のいずれかと配列番号 2 ～ 4 のいずれかとを組み合わせる場合には配列番号 3 2 または 3 3 で表される塩基配列の相補鎖の塩基配列に、ストリンジェントな条件でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドが好ましく、また、プライマーに配列番号 2 1 ～ 2 3 のいずれかと配列番号 2 6 ～ 2 9、6 5 および 6 6 のいずれかとを組み合わせる場合には、配列番号 3 4 で表されるオリゴヌクレオチドを例示することができる。さらにプライマーに配列番号 3 0、3 1 のいずれかと配列番号 2 6 ～ 2 9 のいずれかとを組み合わせる場合には、配列番号 3 4 で表されるオリゴヌクレオチドに加え、配列番号 3 5 で表される塩基配列あるいはその相補鎖の塩基配列にストリンジェントな条件でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドが好ましい。特に好ましい組合せは、プライマーに配列番号 2 1 と配列番号 2 6、6 5 および 6 6 のいずれかとを組み合わせる場合には、プローブとしては配列番号 3 4 で表されるオリゴヌクレオチドを用いることが良い。

かかるプローブは、設計した配列のオリゴヌクレオチドを合成した後、市販のキットを使用して作製することも可能であり、またカスタムオーダーにて委託作製も可能であり、当技術分野では多数委託先が知られている（例えば、Applied Biosystems 社 (<http://www.appliedbiosystems.co.jp>) など）。

本発明の定量方法は、検出（特に定量）対象である特定植物属由来の試料と標準植物試料とを予め定めた比率で混合した補正用サンプルと、被検対象とする食品または食品原材料に既知量の標準植物試料を添加した被検サンプルとを用い、これらのサンプルか

ら同一の手法でゲノム DNA を抽出し、同一の条件で定量的 PCR 法を行うことにより、補正用サンプルについて標準植物由来 DNA のコピー数 ( $L_0$ ) / 特定植物属由来 DNA のコピー数 ( $F_0$ ) の値を補正標準値として求め、被検サンプルについて特定植物属由来 DNA のコピー数 ( $F_s$ ) / 標準植物由来 DNA のコピー数 ( $L_s$ ) の値を求め、これを上記補正標準値を用いて補正して、食品または食品原材料 (1 g) 中に含まれる特定植物属の植物の量 ( $\mu\text{g}$ ) を以下の式によって算出する。

$$\text{特定植物属の植物の量 ppm } (\mu\text{g/g}) = F_s / L_s \times L_0 / F_0 \times 1,000,000$$

したがって、該方法では、被検対象とする食品や食品原材料ごとの DNA 抽出効率や PCR 反応の阻害等の影響、さらには被検対象とする試料中の DNA 含有量の違いに対しても補正が可能である。かかる方法によって、例えば塩等の DNA を含有していない食品原材料や当該原材料を含む食品中の特定植物属に属する植物を適切に定量検出することも可能である。

さらに、偽陽性か否かの判断をする必要がある場合には、PCR 終了後の反応液中に含まれる PCR 増幅産物の DNA 配列を解析することにより、厳密に調べることができる。

本発明に用いる標準植物試料は、種々の成分による DNA 抽出効率への影響がなるべく均質であることが望ましいことから、検出対象である特定植物属に類似の状態のものであることが好ましい。また、検査に供する食品または食品原材料中に混入する可能性のない植物種に由来するものが好ましい。また、栽培過程で、畑地雑草が食用作物に混入する可能性を排除することが極めて困難であり、微量の雑草由来の物質が食用作物中に混入しているとの現状に鑑みて、かかる畑地雑草として認知されている植物種以外の植物種を標準植物試料とすることが好ましい。すなわち、標準植物試料の選定に当たっては、食品または食品原材料に使用する植物が混入する恐れがなく、かつ食品または食品原材料中に混入する恐れがないものを選定する必要がある。

該畑地雑草としては、様々な畑地雑草が知られているが、主には、イネ科、タケ亜科、ガマ科、カヤツリグサ科、キク科、タデ科、ツユクサ科、トクサ科、クワ科、スベリヒユ科、ナデシコ科、アカザ科、マメ科、カタバミ科、トウダイグサ科、セリ科、ヒルガオ科、シソ科、オオバコ科、ナス科、ウリ科などが挙げられる。詳細には、日本雑草学会のホームページ等の記載を参照されたい。

また、例えば市販されている種子等、一度に大量に均一の材料を入手可能で、それ



を保存しておけるものが、標準植物試料としてさらに好ましい。

さらに、標準植物試料は植物のいかなる組織（種子、葉、根茎など）に由来するものでもよいが、検出対象がソバ、小麦および落花生等の種子に由来するものであれば、同様の種子に由来するものであることが好ましい。このような観点から言えば、例えば、すいか、パパイヤ、メロン等を含まない食品について検査する場合には、皮や果肉により外界と隔離された果肉の中に数多くの種子が存在する、すいか、パパイヤ、メロン等の植物種が好ましい。また、種子が外界とは隔離されていなくとも、食用作物として栽培されていない植物種であれば好ましい。このような条件を考慮すると、本発明に用いる標準植物試料としては、上記条件を満たすものであれば特に限定はされないが、ネモフィラ（ハゼリソウ科）、グロキシニア（イワタバコ科）およびスターチス由来のものが挙げられ、スターチス（イソマツ科）の種子が特に好ましい。

標準植物試料としては、DNA 抽出阻害活性または PCR 反応阻害活性を有する成分の含量が高いものは、DNA 抽出効率、ならびに定量的 PCR 法の感度および／または精度等の観点から、避けた方が好ましい。

本明細書中の実施例には、標準植物試料としてスターチスの種子を用いた例を挙げている。上述のように畑地雑草は食用作物に混入する恐れが高く、標準植物試料としては不適切であるため、畑地雑草として日本雑草学会のホームページ (<http://wssj.ac.affrc.go.jp>) に挙げられている 860 種類の植物全部の科名を調べ、その中にない科に属する植物としてスターチスが選択された。スターチスの ITS-1 配列を特異的に検出するプライマーを用いて、一般的な食品原材料である市販の小麦粉 5 種類、コーングリッツ 5 種類、カラシ 3 種類についてスターチスの混入の有無を試験したが、いずれにおいても全く検出されなかったことから、スターチスは、本発明における標準植物試料として好適であると推定された。

尚、スターチスの代わりに、畑地雑草を数多く含むイネ科の中の米を標準植物試料として用いることが好ましくないことを本発明者らは確認している。これは、畑地雑草であるイネ科植物が原材料植物の収穫の際等に、収穫物に混入するためであると考えられる。

標準植物試料として選択した植物材料（例えばスターチスの種子）を粉碎したものを検出対象である特定植物属由来の試料として選択した植物（例えばソバ）の粉碎物と予

め定めた比率で混合して補正用サンプルを用意する。これとは別に、上記と同様の標準植物試料の粉碎物を被検対象である食品または食品原材料に添加して被検サンプルを調製する。なお、上記粉碎工程においては、他の食品原材料や、特に検出対象とする特定植物属由来の試料と標準植物試料とが、お互いに混入しないように、十分に配慮することが重要であり、粉碎に使用する器具等の洗浄等に万全を期すべきである。なお、上記補正用および被検サンプルを調製するに当たっては、補正用サンプル中の特定植物由来の試料の量と被検サンプル中の食品または食品原材料の試料の量はほぼ同じ量とすることが好ましく、また、補正用サンプル中の標準植物試料の量と被検サンプル中の標準試料由来の試料の量はほぼ同じ量とすることが好ましい。

次に、これらサンプルから DNA を抽出する。この DNA の抽出は、種々の公知の方法によって行うことができ、市販のキットまたはプレバックカラムを用いることもできる。例えば、QIAGEN Genomic DNA Handbook や User-Developed Protocol: Isolation of genomic DNA from plants using the QIAGEN Genomic-tip を参考にして、QIAGEN 社製の Genomic-tip を用いればよい。

そして、抽出された DNA を定量的 PCR 法に供する。定量分析のための PCR 技術は、種々のものが公知であるが、TaqMan プローブ（登録商標）を用いるリアルタイム PCR 定量法が簡便かつ有利であろう。

標準植物試料の検出（定量的検出も含む）用のプライマーは、標準植物試料の DNA に特異的な増幅をもたらすプライマーであることが好ましい。さらには、検出対象である特定植物属由来の試料と標準植物試料を予め定めた比率で混合した補正用サンプルから抽出したゲノム DNA に対して定量的 PCR 法を行った時の標準植物由来の DNA のコピー数が、特定植物属由来の DNA のコピー数とかけ離れておらず、両者のコピー数の差が 100 倍以内、好ましくは 10 倍以内になるプライマーであることが、前述の  $L_0/F_0$  比が安定するため好ましい。

例えば、スターチスを標準植物試料とする場合、スターチスのプライマーは、その ITS-1 配列の一部に由来する以下の配列：

5'-TTG GAC GTG TAT CCC TTG TGG TTC-3'（配列番号 57）および

5'-CAC GAA GGT GAA AGT TGC GTT CAT-3'（配列番号 58）

からなるプライマーを用いることができ、さらに、スターチス検出用の TaqMan プローブ

としては、前述した如く、増幅標的配列に対する PCR プライマーがハイブリダイズする部位の内側にハイブリダイズするものであればよく、例えば、ITS-1 配列の一部に由来する以下の配列：

5'-TGT GCG ACG CGG AAT G-3' (配列番号 59)

を有するプローブに蛍光色素を標識して TaqMan プローブとして用いることができる。

リアルタイム PCR 定量法により、補正用サンプルおよび被検サンプルの標準植物由来の DNA のコピー数と検出対象の特定植物属由来の DNA のコピー数を、検量線から算出する。

この検量線の作製は、当業者であれば種々の方法により容易に実施できる。標準植物試料および検出対象の特定植物属由来の試料についての定量的 PCR 法による増幅標的配列を含む既知の長さの DNA をテンプレートとして用いて定量的 PCR 法を実施して検量線を作製することができる。

さらには、標準植物試料および検出対象の特定植物属由来の試料についての定量的 PCR 法による増幅標的配列を含む検量線用のプラスミドを作製し、これをテンプレートに用いることにより、より再現性が高く、誤差の少ない検量線を作製することができる。検出対象とする特定植物属由来の試料の増幅標的配列を含む DNA と、標準植物試料の増幅標的配列を含む DNA とを 1 つのプラスミドベクターに挿入した検量線用プラスミドを作製する。該プラスミドを、大腸菌等で増幅させることにより、検量線用のテンプレートを得ることができる。

例えば、標準植物試料および検出対象の特定植物属由来の試料についての定量的 PCR 法による増幅標的配列を、アウタープライマーとブリッジプライマーを用いる Jayaraman K. らの方法 (1992. BioTechniques 12: 392-398) を用いて連結することができる。

1 つのプラスミド中に標準植物試料および検出対象の特定植物属由来の試料についての増幅標的配列を含有させることにより、希釈による両配列の濃度の誤差を低減させることができる。また、短いプラスミド DNA 分子を用いることによっても、希釈の誤差を低減させ得る。

検量線用テンプレートは、その塩基長が既知であるものを使うため、重量濃度と塩基長より検量線用テンプレート溶液中に含まれるコピー数が決定できる。このコピー数に

照らして、被検サンプル中に含まれるコピー数を算定する。

こうした本発明の定量的 PCR 検出法の考え方は、検出対象である特定の原料が畜産製品等の動物に由来するものである場合、および特定の原料が微生物に由来するものである場合にも適用することは可能であり、検出対象である特定の原料が畜産製品等の動物に由来するものである場合は動物由来の原材料を標準試料とすることが好ましく、特定の原料が微生物に由来するものである場合は、微生物由来の原材料を標準試料とすることが好ましい。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願第 2003-139513 号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 A は、白花ソバについて PCR の感度を調べた結果である。PCR 後、2 % アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイドで染色し、蛍光イメージアナライザーで解析した。

図 1 B は、ダッタンソバについて PCR の感度を調べた結果である。PCR 後、2 % アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイドで染色し、蛍光イメージアナライザーで解析した。

図 2 は、ソバ PCR の特異性を調べた結果である。PCR 後、2 % アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイドで染色し、蛍光イメージアナライザーで解析した。

図 3 は、スターチス PCR の特異性を、他の植物種子について調べた結果である。PCR 後、2 % アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイドで染色し、蛍光イメージアナライザーで解析した。

図 4 は、スターチス PCR の特異性を、種々の食品原材料について調べた結果である。PCR 後、2 % アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイドで染色し、蛍光イメージアナライザーで解析した。

図 5 A は、ソバ DNA の定量的 PCR 法の結果である。ソバ DNA 500pg、小麦、落花生、ダイズ、トウモロコシ、カラシ、胡椒、米はそれぞれ DNA 50ng について定量的 PCR 法を行ったが、ソバ以外では、定量検出域では検出されず、ソバのみが特異的に定量可能であることを確認した。

図 5 B は、ソバ DNA の定量的 PCR 法の結果である。ソバは DNA 500pg、スターチス DNA 50ng について定量的 PCR 法を行ったが、スターチスでは定量検出域では検出されないことを確認した。

図 6 は、ソバ DNA の定量的 PCR 法の結果である。ソバカズラ DNA について定量的 PCR 法を行い、ソバカズラは、DNA 50ng をテンプレートにした場合においても、検量線用プラスミド 10 コピーのテンプレートの場合に対して増幅速度が明らかに遅く、かつ Threshold Line にもかかることはなく、定量検出域では検出されず、ソバのみが特異的に定量可能であることを確認した。

図 7 は、検量線用プラスミドを用いてソバ DNA の定量的 PCR 法を行った結果である。

図 8 は、図 7 の結果から得られたグラフである。

図 9 は、スターチス DNA の定量的 PCR 法の結果である。スターチスは DNA 500pg をテンプレートとして PCR を行った。小麦、落花生、ダイズ、トウモロコシ、カラシ、胡椒、米、ソバカズラはそれぞれ DNA 50ng について定量的 PCR 法を行ったが、定量検出域では検出されず、スターチスのみが特異的に定量可能であることを確認した。

図 10 は、検量線用プラスミドを用いてスターチス DNA の定量的 PCR 法を行った結果である。

図 11 は、図 10 の結果から得られたグラフである。

図 12 は、落花生 PCR の特異性を、種々の食品原材料について調べた結果である。PCR 後、2 % アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイドで染色し、蛍光イメージアナライザーで解析した。

図 13 は、落花生 DNA の定量的 PCR 法の結果である。落花生 DNA 500fg、小麦、ソバ、ダイズ、トウモロコシ、リンゴ、アズキ、スターチスはそれぞれ DNA 50ng について定量的 PCR 法を行ったが、落花生以外では、定量検出域では検出されず、落花生のみが特異的に定量可能であることを確認した。

図 14 は、落花生 DNA を用いて落花生 DNA の定量的 PCR 法を行った結果である。

図 15 は、図 14 の結果から得られたグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

## 実施例 1

### A. DNA 抽出に用いた植物試料

#### (1) ソバの種子：

タカノ株式会社より販売されている白花ソバ（普通ソバ *Fagopyrum esculentum*：2 倍体）、ダツタンソバ（*Fagopyrum tataricum*：2 倍体）の種子を用いた。

#### (2) 小麦、落花生、大豆、とうもろこし、カラシ、スターチスの種子と白胡椒、米（玄米）：

市販品を用いた。

#### (3) 小麦、大豆、とうもろこし、カラシ、ソバカズラの葉：

市販品の種子から発芽させた葉を用いた。

### B. DNA 抽出

#### (1) ソバの種子、白胡椒からの DNA 抽出

QIAGEN Genomic DNA Handbook や User-Developed Protocol: Isolation of genomic DNA from plants using the QIAGEN Genomic-tip を参考にして、QIAGEN 社製の Genomic-tip を用い、以下の方法で行った。

細かく粉碎した試料 1g を 15ml 容チューブに入れ、4ml の Carlson Lysis バッファー (0.1M Tris-HCl (pH 9.5)、2% CTAB、1.4M Polyethylene Glycol #6000、20mM EDTA)、8 $\mu$ l の RNase A (100mg/ml)、10 $\mu$ l の 2-メルカプトエタノール、80 $\mu$ l のプロテイナーゼ K (20mg/ml) を加え、混合した後、74℃で 20 分間保温した。室温に戻した後、これに 5ml のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25：24：1) を加え、良く混合した後、遠心分離により水層を回収した。この水層に等量のクロロホルム：イソアミルアルコール (24：1) を加え、良く混合した後、遠心分離により水層を回収した。再度、この水層に等量のクロロホルム：イソアミルアルコール (24：1) を加え、良く混合した後、遠心分離により水層を回収した。

得られた水層の 1/2 量を取り、イソプロパノール沈殿により沈殿物を回収した。沈殿物は 500 $\mu$ l のバッファー QBT に溶解し、予め 1ml のバッファー QBT で平衡化した Genomic-tip 20/G に供して DNA をカラムに吸着させた。その後、5ml のバッファー QBT、続いて 2ml のバッファー QC でカラムを洗浄した。最終的に 1.7ml のバッファー QF で溶出し、イソプロパノール沈殿により回収した沈殿物を 40 $\mu$ l の滅菌超純水に溶解した。

溶液中の DNA 濃度を測定し、適宜滅菌超純水で希釈したものを PCR の鋳型 DNA 試料とした。

### (2) 小麦、大豆、とうもろこし、カラシ、スターチスの種子と米（玄米）からの DNA 抽出

DNeasy Plant Maxi Kit Handbook を参考にして、QIAGEN 社製の DNeasy Plant Maxi Kit を用い、以下の方法で行った。

細かく粉碎した試料 2g を 50ml 容チューブに入れ、10ml のバッファー AP1、20  $\mu$ l の RNase A (100mg/ml) を加えて混合し、65℃で 15 分間保温した後、約 3,000×g で 10 分間遠心分離した。得られた上清のうち 4ml を 15ml 容チューブに回収し、そこに 1.8ml のバッファー AP2 を加えて、氷中で 10 分間放置した後、約 3,000×g で 10 分間遠心分離した。得られた上清を QIAshredder Spin Column に供し、約 3,000×g で 5 分間遠心分離した。得られたパス液のうち 5ml を 50ml 容チューブに回収し、そこに 7.5ml のバッファー AP3/E を加えて混合した後、DNeasy Spin Column に供し、約 3,000×g で 5 分間遠心分離して DNA を Column に吸着させた。その後、Column に 12ml のバッファー AW を加え、約 3,000×g で 5 分間遠心分離して Column を洗浄、再度 12ml のバッファー AW を加え、約 3,000×g で 10 分間遠心分離して Column を洗浄した。最終的に 65℃で予め保温しておいた 1ml のバッファー AE を Column に加え、10 分間放置後に約 3,000×g で 5 分間遠心分離して Column から DNA を溶出した。溶液中の DNA 濃度を測定し、適宜滅菌超純水で希釈したものを PCR の鋳型 DNA 試料とした。

### (3) 落花生の種子からの DNA 抽出：

QIAGEN Genomic DNA Handbook と NucleoSpin Extract 2 in 1 For Direct Purification of PCR Products を参考にして、QIAGEN 社製の DNeasy Plant Maxi Kit と MACHEREY-NAGEL 社製の NucleoSpin Extract 2 in 1 を組合わせて用い、以下の方法で行った。

細かく粉碎した試料 1g を 15ml 容チューブに入れ、10ml のバッファー G2、100  $\mu$ l の Proteinase K (20mg/ml)、10  $\mu$ l の RNase A (100mg/ml) を加え、混合した後、50℃で 1 時間保温した。その後、約 3,000×g で 10 分間遠心分離し、その上清液を得た。得られた上清液を、予め 1ml のバッファー QBT で平衡化した Genomic-tip 20/G に供して DNA を Column に吸着させた。その後、4ml のバッファー QC で Column を洗浄し、予め 50℃に加温してある 1ml のバッファー QF で溶出させた。溶出液に 4 容量のバッファー NT2 を加

えて混合した後、二本の NucleoSpin Extract Column に一回に 650  $\mu$ l ずつ供し、約 6,000  $\times$ g で 1 分間遠心分離して DNA を Column に吸着させた。これを全液量処理するまで繰り返した。その後、Column に 600  $\mu$ l のバッファー NT3 を加え、約 6,000  $\times$ g で 1 分間遠心分離して Column を洗浄、再度 600  $\mu$ l のバッファー NT3 を加え、最高速度で 1 分間遠心分離して、Column に残っているバッファー NT3 を完全に除去した。最終的に 100  $\mu$ l のバッファー NE を Column に加え、最高速度で 1 分間遠心分離して Column から溶出し、イソプロパノール沈澱により回収した沈澱物を 50  $\mu$ l の滅菌超純水に溶解した。溶液中の DNA 濃度を測定し、適宜滅菌超純水で希釈したものを PCR の鋳型 DNA 試料とした。

#### (4) 小麦、大豆、とうもろこし、カラシ、ソバカズラの葉からの DNA 抽出：

DNeasy Plant Mini Kit Handbook を参考にして、QIAGEN 社製の DNeasy Plant Mini Kit を用い、以下の方法で行なった。

細かく粉碎した試料 0.5g を 15ml 容チューブに入れ、3ml のバッファー AP1、30  $\mu$ l の RNase A (100mg/ml) を加え、混合した後、65℃で 15 分間保温した。その後、これに 975  $\mu$ l のバッファー AP2 を加えて、氷中で 10 分間放置し、遠心分離によりその上清液を得た。得られた上清を QIAshredder Spin Column に供し、遠心分離により Column のパス液を得た。このパス液に 0.5 容量のバッファー AP3、1 容量のエタノールを加えて混合した後、二本の DNeasy Spin Column に一回に 650  $\mu$ l ずつ供し、約 6,000  $\times$ g で 1 分間遠心分離して DNA を Column に吸着させた。これを、全液量処理するまで繰り返した。その後、Column に 500  $\mu$ l のバッファー AW を加え、約 6,000  $\times$ g で 1 分間遠心分離して Column を洗浄、再度 500  $\mu$ l のバッファー AW を Column に加え、最高速度で 1 分間遠心分離して、Column に残っているバッファー AW を完全に除去した。最終的に 65℃で予め保温しておいた 120  $\mu$ l のバッファー AE を Column に加え、約 6,000  $\times$ g で 1 分間遠心分離して Column から溶出した。溶液中の DNA 濃度を測定し、適宜滅菌超純水で希釈したものを PCR の鋳型 DNA 試料とした。

### C. ソバの ITS-1~5.8S rRNA 遺伝子配列の一部を検出する PCR

#### (1) ソバ属検出用プライマー：

プライマー配列には、ソバ属に属する植物の GenBank に登録されている以下の 21 配列中の ITS-1~5.8S rRNA 遺伝子配列に共通な配列を用いた。

1: *Fagopyrum urophyllum* (AB000342)



- 2: *Fagopyrum urophyllum* (AB000341)
- 3: *Fagopyrum tataricum* (sub#species:potanini) (AB000340)
- 4: *Fagopyrum tataricum* (AB000339)
- 5: *Fagopyrum statice* (AB000338)
- 6: *Fagopyrum statice* (AB000337)
- 7: *Fagopyrum pleioramosum* (AB000336)
- 8: *Fagopyrum lineare* (AB000335)
- 9: *Fagopyrum leptopodum* (AB000334)
- 10: *Fagopyrum homotropicum* (AB000333)
- 11: *Fagopyrum gracilipes* (AB000332)
- 12: *Fagopyrum esculentum ancestralis* (AB000331)
- 13: *Fagopyrum esculentum* (AB000330)
- 14: *Fagopyrum cymosum* (AB000329)
- 15: *Fagopyrum cymosum* (AB000328)
- 16: *Fagopyrum cymosum* (AB000327)
- 17: *Fagopyrum cymosum* (AB000326)
- 18: *Fagopyrum cymosum* (AB000325)
- 19: *Fagopyrum cymosum* (AB000324)
- 20: *Fagopyrum capillatum* (AB000323)
- 21: *Fagopyrum callianthum* (AB000322)

そして、下記配列のオリゴ DNA プライマー（株式会社 QIAGEN 社製 OPC 精製品）を合成して、ソバ ITS-1~5. 8S rRNA 遺伝子配列の一部を検出する PCR（以下、ソバ PCR とする）用プライマーとして使用した。

5' - CGC CAA GGA CCA CGA ACA GAA G - 3' （配列番号 14）

5' - CGT TGC CGA GAG TCG TTC TGT TT - 3' （配列番号 15）

（2）ソバ属検出用プライマーの特異性（PCR シミュレーション）：

PCR シミュレーションソフト Amplify 1.0 (Bill Engels) により、ソバ属に属する植物の 21 配列、ソバ以外のアレルギーを起こす恐れのある植物の 8 配列（落花生、小麦、大豆、クルミ、松茸、桃、リンゴ、オレンジ）、食品原材料としてよく使われている植物

の4配列(とうもろこし、米、胡椒、カラシ)、ソバ近縁種の植物の27配列から、ソバ検出用プライマーでPCR増幅産物が得られるシミュレーション結果となるかを確認した。ここでいうソバ近縁種の植物とは、GenBankに登録されている普通ソバ *Fagopyrum esculentum* の塩基配列(AB000330)のITS-1配列部分をBLASTホモロジー検索に供して、Score 60 bits以上となったソバ属以外の植物のことである。今回は、さらにその植物が属する属の中で最もScoreが高い値となった種の配列を、その属の代表の配列として選定した。なお、PCRシミュレーションはそれら配列のITS-1~5.8S rRNA遺伝子~ITS-2配列の領域に対して行った。シミュレーションに用いた配列のGenBank Accession Numberならびに、シミュレーション結果を表1A~1Cに示す。表1A~1Cの省略文字、記号は以下に示す通りである：

黒星印：標的サイズ付近(±10bp)のPCR増幅産物が得られると予想されたもの

W値：PCR増幅産物の得られる可能性

得られる可能性が高い…W6>W5>W4>W3>W2…得られる可能性が低い

数値(bp)：PCR増幅産物のサイズ(bp)

Amplifyで得られた値から2を引いた値

—：PCR増幅産物なしと予想されたもの

表 1A

そば検出用プライマー (配列番号 14 & 配列番号 15) : 増幅産物							
学名 (一般名)		GenBank Accession No.	W6	W5	W4	W3	W2
そば属	★ <i>Fagopyrum urophyllum</i>	AB000342	101bp	—	439bp	—	—
	★ <i>Fagopyrum urophyllum</i>	AB000341	101bp	—	—	—	—
	★ <i>Fagopyrum tataricum</i> (ダツタンそば)	AB000340	101bp	—	—	—	—
	★ <i>Fagopyrum tataricum</i> (ダツタンそば)	AB000339	101bp	—	—	—	—
	★ <i>Fagopyrum statice</i>	AB000338	101bp	—	—	—	—
	★ <i>Fagopyrum statice</i>	AB000337	101bp	—	—	—	—
	★ <i>Fagopyrum pleioramosum</i>	AB000336	101bp	—	—	—	—
	★ <i>Fagopyrum lineare</i>	AB000335	101bp	—	—	—	—
	★ <i>Fagopyrum leptopodum</i>	AB000334	101bp	—	—	—	—
	★ <i>Fagopyrum homotropicum</i>	AB000333	101bp	—	—	—	—
	★ <i>Fagopyrum gracilipes</i>	AB000332	101bp	—	—	—	—
	★ <i>Fagopyrum esculentum</i> (普通そば)	AB000331	101bp	—	—	—	—
	★ <i>Fagopyrum esculentum</i> (普通そば)	AB000330	101bp	—	—	—	—
	★ <i>Fagopyrum cymosum</i>	AB000329	101bp	—	—	—	—
	★ <i>Fagopyrum cymosum</i>	AB000328	101bp	—	—	—	—
	★ <i>Fagopyrum cymosum</i>	AB000327	101bp	—	—	—	—
	★ <i>Fagopyrum cymosum</i>	AB000326	101bp	—	—	—	—
	★ <i>Fagopyrum cymosum</i>	AB000325	101bp	—	—	—	—
	★ <i>Fagopyrum cymosum</i>	AB000324	101bp	—	—	—	—
	★ <i>Fagopyrum capillatum</i>	AB000323	101bp	—	—	—	—
	★ <i>Fagopyrum callianthum</i>	AB000322	101bp	—	440bp	—	—

表 1B

そば検出用プライマー（配列番号 14 & 配列番号 15）：増幅産物							
学名 (一般名)		GenBank Accession No.	W6	W5	W4	W3	W2
アレルギー 特定原材料	<i>Arachis hypogaea</i> (落花生)	AF156675	—	—	—	—	—
	<i>Triticum aestivum</i> (小麦)	AJ301799	—	—	—	—	—
	<i>Glycine max</i> (大豆)	U60551	—	—	—	—	—
	<i>Juglans regia</i> (クルミ)	AF303809	—	—	—	—	—
	<i>Tricholoma matsutake</i> (松茸)	U62964	—	—	—	—	—
	<i>Prunus persica</i> (桃)	AF185621	—	—	—	—	—
	<i>Malus x domestica</i> (リンゴ)	AF186484	—	—	—	—	—
	<i>Citrus sp.</i> (バレンシアオレンジ)	E08821	—	—	—	—	—
主要食品原料	<i>Zea mays</i> (とうもろこし)	U46648	—	—	—	—	—
	<i>Oryza sativa</i> (米)	AF169230	—	—	—	—	—
	<i>Piper nigrum</i> (胡椒)	AF275197	—	—	—	—	—
	<i>Sinapis alba</i> (からし)	X15915	—	—	—	—	—
近縁種 タデ科の	<i>Aconogonum sp. Won 152</i>	AF189731	—	—	—	—	—
	<i>Fallopia scandens</i>	AF040069	—	—	—	—	—
	<i>Polygonum virginianum</i>	U51274	—	—	—	—	—
	<i>Rumex acetosella</i>	AF189730	—	—	—	—	—

表 1C

そば検出用プライマー（配列番号 14 & 配列番号 15）：増幅産物							
学名 (一般名)		GenBank Accession No.	W6	W5	W4	W3	W2
タデ科以外の近縁種	<i>Talinum paraguayense</i>	L78056	—	—	—	—	—
	<i>Bruinsmia styracoides</i>	AF396438	—	—	—	—	—
	<i>Talinella pachypoda</i>	L78054	—	—	—	—	—
	<i>Rehderodendron kwangtungense</i>	AF396448	—	—	—	—	—
	<i>Pterostyrax corymbosus</i>	AF396445	—	—	—	—	—
	<i>Anredera cordifolia</i>	L78086	—	—	—	—	—
	<i>Cistanthe quadripetala</i>	L78062	—	—	—	—	—
	<i>Xenia vulcanensis</i>	L78060	—	—	—	—	—
	<i>Talinopsis frutescens</i>	L78058	—	—	—	—	—
	<i>Talinaria palmeri</i>	L78052	—	—	—	—	—
	<i>Portulaca sp.</i>	L78049	—	—	—	—	—
	<i>Phemeranthus confertiflorus</i>	L78039	—	—	—	—	—
	<i>Montiopsis umbellata</i>	L78033	—	—	—	—	—
	<i>Grahamia bracteata</i>	L78028	—	—	—	—	—
	<i>Herniaria glabra</i>	AJ310965	—	—	—	—	—
	<i>Alluaudia dumosa</i>	L78011	—	—	—	—	—
	<i>Sinojackia xylocarpa</i>	AF396451	—	—	—	—	—
	<i>Halesia macgregori</i>	AF396442	—	—	—	—	—
	<i>Changiosyrax dolichocarpa</i>	AF396439	—	—	—	—	—
	<i>Alectryon subdentatus</i>	AF314765	—	—	—	—	—
	<i>Anacampseros recurvata</i>	L78014	—	—	—	—	—
	<i>Weinmannia racemosa</i>	AF485597	—	—	—	—	—
	<i>Bursera tecomaca</i>	AF080029	—	—	—	—	—

シミュレーションの結果、表 1A～1C に示す通り、ソバ属の 21 配列からは標的とした 101bp のサイズの PCR 増幅産物が得られることが予想された。また、ソバ属以外のアレルギーを起こす恐れのある植物の 8 配列（落花生、小麦、大豆、クルミ、松茸、桃、リンゴ、オレンジ）、食品原材料としてよく使われている植物の 4 配列（とうもろこし、米、胡椒、カラシ）、ソバ近縁種の植物の 27 配列からは、標的サイズの PCR 増幅産物ならび

に非特異的な PCR 増幅産物は得られないことが予想された。

### (3) ソバ PCR :

QIAGEN 社製の HotStarTaq Master Mix Kit を用い、以下の方法で行った。

12.5  $\mu$ l の 2×HotStartTaq Master Mix (HotStar Taq DNA Polymerase、PCR バッファー with 3mM MgCl<sub>2</sub>、400  $\mu$ M each dNTP) に、配列番号 14 と配列番号 15 のプライマーをそれぞれ終濃度で 0.5  $\mu$ M ずつ、及び鋳型 DNA を加え、最終的に滅菌超純水で 25  $\mu$ l とした反応用溶液を 0.2ml マイクロチューブに入れ、Applied Biosystems 社製のサーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9600 により、95℃、15 分 (酵素活性化) の後、95℃、1 分 (変性)、66℃、2 分 (アニーリング)、72℃、1 分 (伸長) のサイクルを 45 回繰り返した後、72℃、4 分 (最終伸長) として反応させた。得られた PCR 反応液をエチジウムブロマイド含有の 2% アガロースゲル電気泳動に供して、Amersham Biosciences 株式会社製の蛍光イメージアナライザー FluorImager 595 により解析した。その結果を図 1A、1B と図 2 に示す。図 1A、1B と図 2 の省略文字、記号などは以下に示す通りである：

M : 100bp DNA Ladder Marker

(一) : 鋳型 DNA 未添加

数字 : 添加した鋳型 DNA 量

矢印 : 標的の PCR 増幅産物のバンド (約 101bp)。

なお、抽出した植物 DNA が PCR 増幅可能なレベルの純度であることは、植物 chloroplast DNA の一部を増幅するプライマーにより、PCR 増幅産物が得られることで確認した。(データ省略)。

### (4) ソバ PCR の感度と特異性 :

ソバ PCR の結果、図 1A、1B に示す通り、白花ソバ (普通ソバ) とダッタンソバ DNA 500 ~ 50fg から標的としたソバ ITS-1 ~ 5.8S rRNA 遺伝子配列から予想される約 101bp のサイズの PCR 増幅産物が得られた。500 ~ 50fg のソバ DNA を検出できる感度とは、ある試料から抽出した DNA 50ng を鋳型として PCR を行った場合、その試料 DNA 中に含まれる 10 ~ 1ppm のソバ DNA を検出できるレベルの感度に相当する。

ソバ PCR の結果、図 2 に示す通り、小麦の葉、落花生の種子、大豆の葉、とうもろこしの葉、カラシの葉、白胡椒、米 DNA 50ng からは標的サイズの PCR 増幅産物ならびに非特異的な PCR 増幅産物は得られなかった。サケ精子 DNA から同様に PCR 増幅産物は得

られないことを確認した（データ省略）。さらに、図 2 に示す通り、ソバ近縁種の一つであるソバカズラの葉 DNA については、50～5ng では非常に薄いながら標的サイズの PCR 増幅産物が得られたものの、500pg 以下では標的サイズの PCR 増幅産物ならびに非特異的な PCR 増幅産物は得られなかった。500pg 以下のソバカズラ DNA を偽陽性で検出しない特異性とは、ある試料から抽出した DNA 50ng を鋳型として PCR した場合、その試料 DNA 中に 1%以下のソバカズラ DNA が存在していたとしても、それが偽陽性として検出されないレベルの特異性に相当する。また、PCR 条件を変更することで、ソバカズラ DNA 50～5ng から標的サイズの産物が得られなくなる可能性もある。

#### （５）ソバ PCR 増幅産物の塩基配列解析：

上記で得られた白花ソバ DNA 由来の PCR 増幅産物の塩基配列は、配列番号 1 4 と配列番号 1 5 のプライマーを用いた両鎖ダイレクトシーケンスにより解析した。得られた塩基配列を、GenBank に登録されている普通ソバ *Fagopyrum esculentum* の塩基配列（AB000330）と比較し、白花ソバ DNA 由来の PCR 増幅産物の塩基配列は、GenBank に登録されている普通ソバ（*Fagopyrum esculentum*）の塩基配列（AB000330）の標的とした部分と 100%合致することを確認した。このことから、上記プライマーを用いた PCR により、ソバ ITS-1～5. 8S rRNA 遺伝子の一部の配列を増幅、検出していることが立証された。

以上の結果より、上記プライマーを用いたソバ PCR により、ソバ属に属する植物全般の ITS-1～5. 8S rRNA 遺伝子配列を、高感度かつ、特異的に検出できることが明らかとなった。本プライマーを、ソバ ITS-1～5. 8S rRNA 遺伝子配列のコピー数を定量する PCR（以下、ソバ配列の定量的 PCR 法とする）に用いることとした。

#### D. スターチス ITS-1 配列の一部を検出する PCR（補正用）

次に、補正に用いる標準植物試料の PCR による検出について検討した。

本実施例においては、日本雑草学会の畑地雑草のリストにはない種子植物であって、種子の入手が容易であるスターチスを標準植物試料として用いた。

#### （１）スターチス検出用プライマー：

GenBank に登録されているスターチスの DNA 配列（AJ222860）を基に、下記配列のスターチス ITS-1 配列の一部を検出する PCR（以下、スターチス PCR とする）用プライマーを設計し、オリゴ DNA プライマー（株式会社 QIAGEN 社製 OPC 精製品）を合成した。

5'-TTG GAC GTG TAT CCC TTG TGG TTC-3'（配列番号 5 7）

5' -CAC GAA GGT GAA AGT TGC GTT CAT-3' (配列番号 58)

#### (2) スターチス PCR :

上記プライマーをそれぞれ終濃度で 0.2  $\mu$ M ずつ用いたこと以外は、基本的に上記実施例 1. C. (3) と同じ方法で行った。その結果を図 3 と図 4 に示す。

なお、抽出した植物 DNA が PCR 増幅可能なレベルの純度であることは、植物 chloroplast DNA の一部を増幅するプライマーにより、PCR 増幅産物が得られることで確認した (データ省略)。

#### (3) スターチス PCR の特異性 :

スターチス PCR の結果、図 3 に示す通り、スターチスの種子 DNA 50ng から標的としたスターチス ITS-1 配列から予想される約 101bp のサイズの PCR 増幅産物が得られた。また、白花ソバ、ダットンソバの種子、小麦の種子、落花生の種子、大豆の種子、とうもろこしの種子、カラシの種子、白胡椒、米、ソバカズラの葉 DNA 50ng からは標的サイズの PCR 増幅産物ならびに非特異的な PCR 増幅産物は得られなかった。サケ精子 DNA から同様に PCR 増幅産物は得られないことを確認した (データ省略)。

したがって、上記スターチス DNA 検出用のプライマーは、スターチス DNA に対する特異性を有していると推測される。

#### (4) 食品原材料へのスターチス混入の有無の評価 :

次に、スターチスが標準植物試料として適切であることを確認する。すなわち、食品または食品原材料中に混入していないことを確認するため、スターチス PCR を行った。

スターチス PCR の結果、図 4 に示す通り、5 種類の小麦粉、5 種類のコーングリッツ、3 種類のカラシの種子 DNA 50ng からは標的サイズの PCR 増幅産物ならびに非特異的な PCR 増幅産物は得られなかった。

#### (5) スターチスへのソバ混入の有無の評価 :

スターチスの種子の試料中に、ソバが混入していないか否かを確認するために、後述の通りに確立したソバ配列の定量的 PCR 法で確認した。ソバ配列の定量的 PCR 法の結果、スターチスの種子 DNA からは増幅を示す蛍光シグナルの立上がりはみられず、混入は認められないことを確認した (データ省略)。

#### (6) スターチス PCR 増幅産物の塩基配列解析 :

上記で得られたスターチス DNA 由来の PCR 増幅産物の塩基配列は、配列番号 57 と配



列番号 58 のプライマーを用いた両鎖ダイレクトシーケンスにより解析した。なお、得られた塩基配列を、GenBank に登録されているスターチス *Limonium sinuatum* の塩基配列 (AJ222860) と比較し、スターチス DNA 由来の PCR 増幅産物の塩基配列は、GenBank に登録されているスターチス *Limonium sinuatum* の塩基配列 (AJ222860) の標的とした部分と 100% 合致することが確認された。スターチス PCR により、標的とした、スターチス ITS-1 の一部の配列を増幅、検出していることが確認できた。

以上の結果より、スターチスは、食品原材料との相互混入がなく、補正用の標準植物試料として適切であることが示唆された。そこで、配列番号 57 と配列番号 58 のプライマーを、スターチス ITS-1 配列のコピー数を定量する PCR (以下、スターチス配列の定量的 PCR 法とする) に用いることとした。

#### E. 定量解析に用いる検量線用プラスミドの作製

##### (1) ソバとスターチス PCR の標的 DNA 配列の連結 PCR と連結 PCR 増幅産物の塩基配列解析:

ソバ標的増幅産物とスターチス標的増幅産物を PCR 法により連結し、TA クローニングベクターに導入して大腸菌に形質転換して増幅させることにより、ソバとスターチスのコピー数を定量解析するための検量線用プラスミドを作製した。

まず、下記配列のオリゴ DNA プライマー (株式会社 QIAGEN 社製 OPC 精製品) を合成してプライマーとして使用した。これらのプライマーは、上述のソバとスターチス PCR に用いたソバおよびスターチスのプライマー部位を含んでいる。

5' - TCT AGA CGC CAA GGA CCA CGA ACA GAA G - 3' (配列番号 60)

5' - CAA AAG CTT CGT TGC CGA GAG TCG TTC TGT TT - 3' (配列番号 61)

5' - ACG AAG CTT TTG GAC GTG TAT CCC TTG TGG TTC - 3' (配列番号 62)

5' - GGA TCC CAC GAA GGT GAA AGT TGC GTT CAT - 3' (配列番号 63)。

Jayaraman K ら (1992. A PCR-Mediated Gene Synthesis Strategy Involving the Assembly of Oligonucleotides Representing Only One of the Strands. *BioTechniques* 12: 392-398) の方法を参考にして、QIAGEN 社製の HotStarTaq Master Mix Kit を用いて以下の方法により、連結プラスミドを作製した。

25  $\mu$ l の 2×HotStartTaq Master Mix (HotStar Taq DNA Polymerase、3mM MgCl<sub>2</sub> 含有 PCR バッファー、400  $\mu$ M 各 dNTP) に、さらに dNTP を終濃度で 500  $\mu$ M となるように加え、

配列番号 6 0 と配列番号 6 3 をアウタープライマーとしてそれぞれ終濃度で  $1.0 \mu\text{M}$  ずつ、配列番号 6 1 と配列番号 6 2 をブリッジプライマーとしてそれぞれ終濃度で  $25\text{nM}$  ずつ加え、さらに、鋳型 DNA として実施例 1. C. (4) で得られたソバ PCR の標的 DNA 配列を持つ PCR 増幅産物と実施例 1. D. (3) で得られたスターチス PCR の標的 DNA 配列を持つ PCR 増幅産物を加え、最終的に滅菌超純水で  $50 \mu\text{l}$  とした反応用溶液を  $0.2\text{ml}$  マイクロチューブに入れ、MJ Research 社製のサーマルサイクラー PTC-200 DNA Engine により、 $95^{\circ}\text{C}$ , 15 分 (酵素活性化) の後、 $95^{\circ}\text{C}$ , 1 分 (変性)、 $40^{\circ}\text{C}$ , 1 分 (アニーリング)、 $72^{\circ}\text{C}$ , 1 分 (伸長) のサイクルを 15 回繰り返す、さらに  $95^{\circ}\text{C}$ , 1 分 (変性)、 $66^{\circ}\text{C}$ , 1 分 (アニーリング)、 $72^{\circ}\text{C}$ , 1 分 (伸長) のサイクルを 30 回繰り返して反応させた。得られた PCR 反応液をエチジウムブロマイド含有の 2% アガロースゲル電気泳動に供して、アマシャムバイオサイエンス株式会社製の蛍光イメージアナライザー FluorImager 595 により解析した。なお、得られた PCR 増幅産物の塩基配列は、配列番号 6 0 と配列番号 6 3 のプライマーを用いた両鎖ダイレクトシーケンスにより解析した。

連結 PCR の結果、予想された約  $220\text{bp}$  の PCR 増幅産物が得られた (データ省略)。塩基配列解析の結果、この PCR 増幅産物には、ソバとスターチス PCR の標的 DNA 配列とが含まれていることが確認できた (データ省略)。

#### (2) 連結 PCR 増幅産物のプラスミドへの導入と導入 DNA 断片の塩基配列解析：

上記で得られた PCR 増幅産物を、pGEM-T Easy Vector System (Promega 社製) を用いて pGEM-T Easy Vector に TA cloning し、大腸菌 (*E. coli* JM109 (DH5  $\alpha$ )) に形質転換した。コロニー PCR ならびに塩基配列解析によりソバとスターチス PCR の標的 DNA 配列が含まれていることが確認できた約  $220\text{bp}$  の導入断片を持つ形質転換体を LB 培地で液体培養して、菌体から QIAGEN 社製の QIAGEN Hi Speed Plasmid Midi Kit を用いてプラスミドを抽出、精製した。なお、精製したプラスミドに導入された DNA 断片の塩基配列は、プラスミド上にある配列のプライマーを用いた両鎖シーケンスにより解析した結果、意図した通り、形質転換体のプラスミドに導入された DNA 断片の塩基配列には、ソバとスターチス PCR の標的 DNA 配列が含まれていることが確認できた (データ省略)。

#### (3) 検量線用プラスミドの希釈系列の調製：

プラスミドの長さ、上記で抽出、精製したプラスミドの吸光値 (Abs.  $260\text{nm}$ ) から、プラスミドの分子数 (コピー数) を計算した。 $5\text{ng}/\mu\text{l}$  のサケ精子 DNA (和光純薬社製 デ

オキシリボ核酸ナトリウム サケ精巢製 繊維状を滅菌超純水に溶解したもの) でプラスミドを希釈して、 $10^9 \sim 10^1$  コピー/ $2.5 \mu\text{l}$  の検量線用プラスミド希釈系列を作製した。これを、ソバとスターチス配列の定量的 PCR 法の検量線作成に用いることとした。

#### F. ソバ配列のコピー数を定量する PCR

##### (1) ソバ配列の検出用 TaqMan MGB プローブ :

下記配列の TaqMan MGB プローブ (Applied Biosystems Japan 株式会社製 リポーター色素 FAM) を合成して、ソバ配列の検出用プローブとして使用した。なお、プローブ配列には、ソバ属に属する植物の ITS-1~5. 8S rRNA 遺伝子配列として GenBank に登録されている 21 配列に共通な配列を用いた。

5' -CGG GAC GCG CTT C-3' (配列番号 6 4)

##### (2) ソバ配列の定量的 PCR 法 :

QIAGEN 社製の QuantiTect Probe PCR Kit を用い、以下の方法で行った。

$12.5 \mu\text{l}$  の  $2 \times$  QuantiTect Probe PCR Master Mix に、配列番号 1 4 と配列番号 1 5 のプライマーを終濃度でそれぞれ  $0.2 \mu\text{M}$  ずつと、配列番号 6 4 の TaqMan MGB プローブを終濃度で  $0.2 \mu\text{M}$ 、及び鋳型 DNA を加え、最終的に滅菌超純水で  $25 \mu\text{l}$  とした溶液を 96 穴 PCR プレートに分注した。なお、検量線用としては、鋳型 DNA の代わりに、検量線用プラスミド DNA の希釈系列を加えた溶液を分注した。分注した 96 穴 PCR プレートを、Applied Biosystems 社製の Real Time PCR 装置 Sequence Detection System 7700 にセットし、 $50^\circ\text{C}$ , 2 分、 $95^\circ\text{C}$ , 15 分の後、 $95^\circ\text{C}$ , 1 分 (変性)、 $66^\circ\text{C}$ , 2 分 (アニーリング)、 $72^\circ\text{C}$ , 1 分 (伸長) のサイクルを 45 回繰り返して反応させた。反応は全て同一試料を 2 ウェル並行で行なった。反応終了後、伸長ステップにおける蛍光データを解析した。なお、ベースラインは、始めに 0-1 サイクルに設定して蛍光の立ち上がりの始まるサイクルを確認して、そのサイクルよりも前の範囲で適宜設定した。また、閾値ライン (Threshold Line) の設定は、Kuribara H et al. 2002. Novel Reference Molecules for Quantitation of Genetically Modified Maize and Soybean. Journal of AOAC International 85: 1077-1089 に記載の方法に従って行なった。その結果を図 5 A および B、図 6、図 7 と図 8 に示す。

なお、抽出した植物 DNA が PCR 増幅可能なレベルの純度であることは、植物クロロプラスチ DNA の一部を増幅するプライマーにより、PCR 増幅産物が得られることで確認し

た（データ省略）。

### （３）ソバ配列の定量的 PCR 法の特異性：

ソバ配列の定量的 PCR 法の結果、図 5 A および B に示す通り、白花ソバの種子 DNA から増幅を示す蛍光シグナルの立ち上がりが確認された。一方、小麦の葉、落花生の種子、大豆の葉、とうもろこしの葉、カラシの葉、白胡椒、米、スターチスの種子 DNA 50ng からは増幅を示す蛍光シグナルの立ち上がりは認められなかった。サケ精子 DNA から増幅を示す蛍光シグナルの立ち上がりは認められなかった。（データ省略）なお、図 6 に示す通り、ソバカズラの葉 DNA 50ng で増幅シグナルの立ち上がりはみられたものの、その立ち上がりは検量線の 10copy よりも遅い立ち上がりサイクル数（Ct 値）、かつ Threshold Line にかからなかった。

この特異性は、ある試料にスターチスを添加したものから抽出した DNA 50ng を鋳型として PCR を行った場合、その試料が 100%食用ではない雑草の一種のソバカズラ（ソバ近縁種）であったとしても、それが偽陽性として定量されないレベルに相当する。

### （４）ソバ配列の定量的 PCR 法の定量性と感度：

ソバ配列の定量的 PCR 法の結果、図 7 と図 8 に示す通り、 $10^8 \sim 10^1$  コピーの検量線用プラスミドで、相関係数 0.999、かつ傾き -3.504 の検量線を引くことができる定量性と感度を確認できた。また、白花ソバ DNA 50fg から増幅を示す蛍光シグナルの立ち上がりがみられる感度を確認でき、さらには白花ソバ DNA 5ng~50fg の Ct 値をプロットすると、この範囲でも相関のある直線を引くことができる定量性を確認できた（データ省略）。

以上の結果より、配列番号 14 と配列番号 15 のプライマー、配列番号 64 のプローブを用いたソバ配列の定量的 PCR 法により、ソバ属に属する植物全般の ITS-1~5.8S rRNA 遺伝子配列を高感度かつ特異的に検出し、そのコピー数を定量できることが明らかとなった。本ソバ配列の定量的 PCR 法と次に示す補正用のスターチス配列の定量的 PCR 法と組合わせて、ソバの混入量測定に用いることとした。

## G. スターチス配列のコピー数を定量する PCR

### （１）スターチス配列の検出用 TaqMan MGB プローブ：

下記配列の TaqMan MGB プローブ（Applied Biosystems Japan 株式会社製 リポーター色素 FAM）を合成して、スターチス配列の検出用プローブとして使用した。

5'-TGT GCG ACG CGG AAT G-3'（配列番号 59）

## (2) スターチス配列の定量的 PCR 法と解析：

配列番号 57 と配列番号 58 のプライマーをそれぞれ終濃度で  $0.2\mu\text{M}$  ずつ用いたこと、配列番号 59 の TaqMan MGB プローブを終濃度で  $0.2\mu\text{M}$  用いたこと以外は、基本的に実施例 1. の F. (2) と同じ方法で行なった。その結果を図 9、図 10 と図 11 に示す。

## (3) スターチス配列の定量的 PCR 法の特異性：

スターチス配列の定量的 PCR 法の結果、図 9 に示す通り、スターチスの種子 DNA から増幅を示す蛍光シグナルの立ち上がりが見られた。一方、白花ソバとダツタンソバの種子、小麦の種子、落花生の種子、大豆の種子、とうもろこしの種子、カラシの種子、白胡椒、米、ソバカズラの葉 DNA 50ng からは増幅を示す蛍光シグナルの立ち上がりが見られなかった。サケ精子 DNA からも増幅を示す蛍光シグナルの立ち上がりはみられなかった（データ省略）。

## (4) スターチス配列の定量的 PCR 法の定量性：

スターチス配列の定量的 PCR 法の結果、図 10 と図 11 に示す通り、 $10^8 \sim 10^1$  コピーの検量線用プラスミドで、相関係数 0.999、かつ傾き  $-3.386$  の検量線を引くことができる定量性を確認できた。

以上の結果より、配列番号 57 と配列番号 58 のプライマー、配列番号 59 のプローブを用いたスターチス配列の定量的 PCR 法により、スターチスの ITS-1 配列を特異的に検出し、そのコピー数を定量できることが明らかとなった。補正用の本スターチス配列の定量的 PCR 法と実施例 1. F. に示したソバ配列の定量的 PCR 法と組合わせて、ソバの混入量測定に用いることとした。

## 実施例 2

### A. 標準としたスターチスと、各種ソバ粉、擬似混入試料の作製に用いたソバ、米、小麦

#### (1) スターチス：

サカタのタネより販売されている切花用エキセレントライトブルー（単一ロット品）を用いた。

#### (2) ソバ：

タカノ株式会社より販売されている白花ソバ（普通ソバ *Fagopyrum esculentum*：2 倍

体) のソバ粉、ダツタンソバ (*F. tataricum* : 2 倍体) のソバ粉、高嶺ルビー (*F. esculentum* : 2 倍体) のソバ粉、グレートルビー (*F. esculentum* : 4 倍体) のソバ粉を用いた。なお、擬似混入試料の作製には、白花ソバ粉を用いた。

(3) 小麦 :

市販の農林 61 号を用いた。

(4) 米 :

市販の秋田小町の無農薬玄米を用いた。

B. 標準としたスターチスと、擬似混入試料の作製に用いた米、小麦の粉碎と DNA 抽出

(1) 粉碎 :

粉碎は、Retsch 社製の超遠心粉碎機 Ultra Centrifugal Mill ZM1 にロータ (ステンレス鋼製 24 本刃) とスクリーン (ステンレス鋼製 0.20mm) をセットして行った。

(2) 粉碎機の洗浄 :

試料の粉碎前と後に、粉碎機の試料受け皿、試料蓋、ロータ、スクリーン、とめ具類、治具などの部品は、水洗浄、10%ブリーチ溶液に浸漬、水洗浄、乾燥して使用した。粉碎機の本体部分は、エアガン洗浄、拭き掃除して使用した。

(3) 粉碎機にソバとスターチス汚染がないことの確認 :

大量粉碎前に、その試料の一部、あるいはソバやスターチスの混入が無い市販の皮付きとうもろこしを凍結乾燥したものを粉碎して、そこから DNA を抽出し、実施例 1. F. と G. に記載のソバ配列やスターチス配列の定量的 PCR 法で、50ng の鋳型 DNA から増幅の立ち上がりを示す蛍光シグナルの有無を確認した。蛍光シグナルがなかった場合には汚染がないと判断して、以下の大量粉碎に進んだ。蛍光シグナルがあった場合には汚染があると判断して、粉碎機を再度洗浄し、ソバやスターチスの混入が無いことを確認済みの玄米 (1kg) を当該粉碎機で粉碎した後、洗浄するとともに新品スクリーンに交換を行った後、再度上記ソバやスターチスの混入が無い市販の皮付きとうもろこしを凍結乾燥したものを粉碎し、同様の方法で蛍光シグナルの有無を確認し、粉碎機にソバとスターチスの汚染がないと判断できた上で、以下の大量粉碎に進んだ。

(4) スターチスの大量粉碎と、その粉碎物にソバの混入がないことの確認 :

ソバの汚染が無いことを確認した粉碎機で、約 1kg のスターチスを粉碎した。粉碎物から 2g ずつ 10 点サンプリングして、実施例 1. B. (2) に記載の方法で DNeasy Plant

Maxi Kit により DNA を抽出し、ソバ配列の定量的 PCR 法で、50ng の鋳型 DNA から増幅の立ち上がりを示す蛍光シグナルがないことを確認した（データ省略）。これにより、ソバの混入がない、スターチスの粉碎物を確保した。

（５）米、小麦の大量粉碎と、それらの粉碎物にソバとスターチスの汚染がないことの確認：

ソバとスターチスの汚染が無いことを確認した粉碎機で、約 500g の米を粉碎した。粉碎物から 2g ずつ 5 点サンプリングして、実施例 1 . B . ( 2 ) に記載の方法で DNeasy Plant Maxi Kit により DNA を抽出し、ソバ配列とスターチス配列の定量的 PCR 法で、50ng の鋳型 DNA から増幅の立ち上がりを示す蛍光シグナルがないことを確認した（データ省略）。小麦も同様にして行った。これにより、ソバとスターチスの混入がない、米、小麦の粉碎物を確保した。

C. 擬似混入試料の作製

（１）ソバ粉／米の粉碎物の擬似混入試料：

静防 0P [特殊静防処理] PZ タイプ（三方チャック袋）の号数 No. 6（福助工業株式会社）に、米の粉碎物 45.00g をはかり込んだものを 6 個準備して、No. 1～6 の番号を付けた。ソバ粉 5.00g を No. 1 の袋にはかり込み、袋の口を閉じて手で 15 分間混合して、10%のソバ粉を含む米の粉碎物を得た。続いて、この 10%（100,000ppm）のソバ粉を含む米の粉碎物 5.00g を No. 2 の袋にはかり込み、袋の口を閉じて手で 15 分間混合して、1%（10,000ppm）のソバ粉を含む米の粉碎物を得た。この希釈、混合操作を繰り返し、100,000～1ppm のソバ粉を含む米の粉碎物を作製した。

（２）ソバ粉／小麦の粉碎物の擬似混入試料：

同様にして、100,000～1ppm のソバ粉を含む小麦の粉碎物を作製した。

（３）ソバ粉／米と小麦の粉碎物の擬似混入試料：

静防 0P [特殊静防処理] PZ タイプ（三方チャック袋）の号数 No. 5（福助工業株式会社）に、10ppm のソバ粉を含む米の粉碎物 12.5g と 10ppm のソバ粉を含む小麦の粉碎物 12.5g をはかり込み、袋の口を閉じて手で 15 分間混合して、10ppm のソバ粉を含む米と小麦の粉碎物を作製した。

D. DNA 抽出時の擬似混入試料サンプリングスケールの決定

（１）白花ソバ粉の粒度分布測定：

ソバ粉を球と仮定した時の粒径を求めるため、白花ソバ粉の粒度分布測定（レーザー回折・散乱法・乾式、圧力  $0.5\text{kg}/\text{cm}^2$  の条件）を行なった。測定は、粉株式会社セイシン企業の粉体測定技術センターに依頼した。結果、白花ソバ粉の累積 50% の粒径（X50）は  $80.941\mu\text{m}$  となった。

## （２）白花ソバ粉のカサ密度測定：

ソバ粉の密度（粉の内部にある空隙を含めた密度）を求めるため、白花ソバ粉のカサ密度測定（Hg 法・一定体積のセルにソバ粉を入れた後に水銀でセルを満たす方法）を行なった。測定は、粉株式会社セイシン企業の粉体測定技術センターに依頼した。結果、白花ソバ粉のカサ密度（水銀法）は  $1.181\text{g}/\text{cm}^3$  となった。

ソバ粉の占める体積 = （セルの体積）－（入れた水銀の体積）

ソバ粉のカサ密度（水銀法） = （入れたソバ粉の重量）／（ソバ粉の占める体積）

## （３）擬似混入試料中のソバ粉粒数の試算とサンプリングスケールの決定：

白花ソバ粉の粒径  $80.941\mu\text{m}$  と密度  $1.181\text{g}/\text{cm}^3$  の測定値から、ソバ粉一粒あたりの重さを計算し、種々のソバ粉濃度の擬似混入試料中に存在するソバ粉の粒数を試算した。結果を表 2 に示す。今回、定量の目標とした混入量 10ppm のソバを含む擬似混入試料から DNA 抽出のための試料をサンプリングする場合、サンプリングした試料の中に最低でも 100 粒程度のソバ粉が入る様にしようとする、サンプリング量は 4g 以上必要ということがわかった。DNA 抽出には 5g サンプリングすることとした。

表 2 擬似混入試料中の白花そば粉の粒子数

擬似混入試料中の 白花そば粉濃度 (ppm: $\mu\text{g}/\text{g}$ )	擬似混入試料を Ng サンプリングした時の 白花そば粉の粒子数（そば粉一粒 $0.3277\mu\text{g}$ で計算）			
	N(g)=	2	4	5
1,000,000 ppm		3,051,167	12,204,669	15,255,836
100,000 ppm		305,117	1,220,467	1,525,584
10,000 ppm		30,512	122,047	152,558
1,000 ppm		3,051	12,205	15,256
100 ppm		305	1,220	1,526
10 ppm		31	122	153
1 ppm		3	12	15

100 粒以上



E. 100%ソバ粉+スターチス標準、擬似混入試料+スターチス標準からの DNA 抽出(1) 各種ソバ粉試料：

白花ソバ粉を 6 点、高値ルビーソバ粉、グレートルビーソバ粉、ダットンソバ粉をそれぞれ 3 点サンプリングして DNA 抽出に用いた。

(2) 擬似混入試料：

100ppm 白花ソバ粉／小麦の粉碎物、10ppm 白花ソバ粉／小麦の粉碎物、10ppm 白花ソバ粉／米の粉碎物、10ppm 白花ソバ粉／小麦と米の粉碎物をそれぞれ 3 点サンプリングして、DNA 抽出に用いた。

(3) DNA 抽出：

QIAGEN Genomic DNA Handbook や User-Developed Protocol: Isolation of genomic DNA from plants using the QIAGEN Genomic-tip を参考にして、QIAGEN 社製の Genomic-tip を用い、以下の方法で行った。

試料 5g とスターチス粉碎物 1g を 50ml 容チューブに入れ、30ml の Carlson Lysis バッファー (0.1M Tris-HCl (pH 9.5)、2% CTAB、1.4M Polyethylene Glycol #6000、20mM EDTA)、60  $\mu$ l の RNase A (100mg/ml)、75  $\mu$ l の 2-メルカプトエタノール、600  $\mu$ l のプロテイナーゼ K (20mg/ml) を加え、さらに試料の分散性を高めるためにジルコニアボール (株式会社ニッカトー社製 YTZ ボール  $\phi$ 7mm) 3 つを入れてシェーカー (イワキ産業株式会社製 KM Shaker V-DX) で 10 分間以上ダマが無くなるまで混合 (SPEED 100) した後、74℃で 20 分間保温した。なお、保温中は 5 分おきにチューブを手で振って混合した。

3,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離した後、15ml 容チューブに上清を 4ml とり、5ml のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1) を加えて良く混合した。これを、3,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離した後、15ml 容チューブに上清 (水層) をとり、3.5ml のクロロホルム：イソアミルアルコール (24:1) を加えて良く混合した。これを、3,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離した後、15ml 容チューブに上清 (水層) をとり、再度クロロホルム：イソアミルアルコール (24:1) 抽出と遠心分離を行い、上清 (水層) を回収した。上清 (水層) のうちの 150  $\mu$ l からイソプロパノール沈殿により回収した沈殿物を 100  $\mu$ l の滅菌超純水に溶解した後、900  $\mu$ l のバッファー QBT を加えたものを、予め 1ml のバッファー QBT で平衡化した Genomic-tip 20/G に供して DNA をカラムに吸着させた。そ

の後、4ml のバッファー QC でカラムを洗浄した。最終的に 1ml のバッファー QF で DNA 溶出し、イソプロパノール沈殿により回収した沈殿物を 40  $\mu$ l の滅菌超純水に溶解した。溶液中の DNA 濃度を測定し、適宜滅菌超純水で希釈したものを PCR の鋳型 DNA 試料とした。

F. スターチス標準を添加した 100%ソバ粉から抽出した DNA 中の「スターチス配列のコピー数／ソバ配列のコピー数比」の算出

ソバ配列とスターチス配列の定量的 PCR 法は、実施例 1. の F. と G. に記載の方法で行なった。検量線をもとに、スターチス標準を添加した 100%ソバ粉から抽出した DNA 50ng 中のソバ配列のコピー数と、スターチス配列のコピー数を定量した。その定量値をもとに、「スターチス配列のコピー数／ソバ配列のコピー数 =  $L_0/F_0$  比」を算出した。なお、各ソバ粉の  $L_0/F_0$  比は、同一サンプルを 2 ウェル並行で測定し、測定を二回繰り返して得られた比を平均して算出した。

$L_0/F_0$  比測定の結果、表 3 に示す通り、白花ソバ粉 2.36 (6 点抽出、各点 2 ウェル測定、測定 2 回)、高嶺ルビーソバ粉 3.25、グレートルビーソバ粉 2.70、ダットンソバ粉 4.75 (3 点抽出、各点 2 ウェル測定、測定 2 回) となった。ここで得られた白花ソバ粉の  $L_0/F_0$  比と、実施例 2. G. で算出した擬似混入試料の「ソバ配列のコピー数／スターチス配列のコピー数 =  $F_s/L_s$  比」を用いて、ソバの混入量を求めることとした。なお、各種ソバ粉の  $L_0/F_0$  比を測定した時の生データを表 4A と表 4B に示す。

表 3 各種そば粉の Lo/Fo 比

試料名		Lo / Fo 1回目測定		Lo / Fo 2回目測定		Lo / Fo 1回目と2回目測定の 平均
		測定値	平均	測定値	平均	
白花そば粉 100%	No. 1	2.23	2.37	2.24	2.36	2.36
	No. 2	2.38		2.44		
	No. 3	2.12		2.11		
	No. 4	2.84		2.70		
	No. 5	2.12		2.11		
	No. 6	2.50		2.56		
ダットンそば粉 100%	No. 1	4.33	4.82	4.06	4.69	4.75
	No. 2	5.42		5.27		
	No. 3	4.70		4.72		
高嶺ルビーそば粉 100%	No. 1	3.40	3.20	3.66	3.30	3.25
	No. 2	2.58		2.40		
	No. 3	3.61		3.85		
グレートルビーそば粉 100%	No. 1	2.39	2.67	2.38	2.72	2.70
	No. 2	2.92		2.92		
	No. 3	2.72		2.87		

表4A 各種そば粉のLo/Fo比測定の実データ (1回目測定)  
各種そば粉の測定の実データ (1 回目)

<i>Fagopyrum</i> : そば配列コピー数の定量 PCR サンプルインフォメーション (そば粉)			
サンプル	Ct	コピー数	コピー数平均 (Fo copy)
白花 そば粉 100%	No. 1	14.4 2.70E+07	26,018,826
		14.6 2.50E+07	
	No. 2	14.8 2.10E+07	20,441,034
		14.9 2.00E+07	
	No. 3	14.3 3.00E+07	29,482,716
		14.4 2.90E+07	
	No. 4	14.7 2.30E+07	22,277,192
		14.8 2.20E+07	
	No. 5	14.3 3.00E+07	29,360,360
		14.4 2.80E+07	
	No. 6	14.6 2.50E+07	24,691,600
		14.6 2.40E+07	
ダッタン そば粉 100%	No. 1	15.2 1.60E+07	14,956,499
		15.4 1.40E+07	
	No. 2	15.6 1.30E+07	12,823,798
		15.6 1.30E+07	
	No. 3	15.3 1.60E+07	14,854,976
		15.4 1.40E+07	
高嶺ルビー そば粉 100%	No. 1	15.1 1.70E+07	17,177,656
		15.2 1.70E+07	
	No. 2	14.4 2.80E+07	26,409,548
		14.6 2.50E+07	
	No. 3	14.9 2.00E+07	19,925,876
		14.9 1.90E+07	
グレートルビー そば粉 100%	No. 1	14.3 3.00E+07	28,209,852
		14.5 2.70E+07	
	No. 2	14.7 2.30E+07	22,488,190
		14.8 2.20E+07	
	No. 3	14.4 2.80E+07	26,490,346
		14.6 2.50E+07	

サンプルインフォメーション (検量線用プラスミド)			
サンプル	Ct	コピー数	コピー数平均 (Fo copy)
1,000 copy	29.7	1.00E+03	1,000
	30.0	1.00E+03	
10,000 copy	26.3	1.00E+04	10,000
	26.3	1.00E+04	
100,000 copy	22.9	1.00E+05	100,000
	22.8	1.00E+05	
1,000,000 copy	19.3	1.00E+06	1,000,000
	19.3	1.00E+06	
10,000,000 copy	15.7	1.00E+07	10,000,000
	15.7	1.00E+07	
100,000,000 copy	12.7	1.00E+08	100,000,000
	12.8	1.00E+08	
テンプレートなし	45.0		0
コントロール	45.0		

検量線

傾き: -3.461

相関係数: 0.999

ベースライン: (3, 10)

Y切片: 40.165

閾値ライン: 0.26

<i>Limonium</i> : スターチス配列コピー数の定量 PCR サンプルインフォメーション (そば粉)			
サンプル	Ct	コピー数	コピー数平均 (Lo copy)
白花 そば粉 100%	No. 1	13.8 5.70E+07	58,115,672
		13.7 5.90E+07	
	No. 2	14.0 4.90E+07	48,713,304
		14.0 4.90E+07	
	No. 3	13.6 6.20E+07	62,454,708
		13.6 6.30E+07	
	No. 4	13.7 6.10E+07	63,166,024
		13.6 6.50E+07	
	No. 5	13.6 6.20E+07	62,256,136
		13.6 6.20E+07	
	No. 6	13.7 6.10E+07	61,832,168
		13.6 6.20E+07	
ダッタン そば粉 100%	No. 1	13.6 6.50E+07	64,791,648
		13.6 6.50E+07	
	No. 2	13.5 6.90E+07	69,477,952
		13.5 6.90E+07	
	No. 3	13.4 7.20E+07	69,844,016
		13.5 6.80E+07	
高嶺ルビー そば粉 100%	No. 1	13.8 5.60E+07	58,425,484
		13.7 6.00E+07	
	No. 2	13.5 6.70E+07	68,158,464
		13.5 6.90E+07	
	No. 3	13.4 7.10E+07	72,032,008
		13.4 7.30E+07	
グレートルビー そば粉 100%	No. 1	13.5 6.70E+07	67,316,112
		13.5 6.80E+07	
	No. 2	13.6 6.50E+07	65,631,320
		13.5 6.70E+07	
	No. 3	13.4 7.20E+07	71,952,496
		13.4 7.20E+07	

サンプルインフォメーション (検量線用プラスミド)			
サンプル	Ct	コピー数	コピー数平均 (Lo copy)
1,000 copy	29.7	1.00E+03	1,000
	30.0	1.00E+03	
10,000 copy	26.6	1.00E+04	10,000
	26.8	1.00E+04	
100,000 copy	23.1	1.00E+05	100,000
	23.1	1.00E+05	
1,000,000 copy	19.6	1.00E+06	1,000,000
	19.6	1.00E+06	
10,000,000 copy	16.1	1.00E+07	10,000,000
	16.2	1.00E+07	
100,000,000 copy	13.1	1.00E+08	100,000,000
	13.1	1.00E+08	
テンプレートなし	45.0		0
コントロール	45.0		

検量線

傾き: -3.390

相関係数: 0.999

ベースライン: (3, 10)

Y切片: 40.055

閾値ライン: 0.26

表4A 各種そば粉のLo/Fo比測定の実データ (1回目測定)

各種そば粉の Lo/Fo 比 (1回目測定)		
サンプル	そば粉 100% のLo/Fo 比	
	測定値	平均
白花 そば粉 100%	No. 1    2.23	2.37
	No. 2    2.38	
	No. 3    2.12	
	No. 4    2.84	
	No. 5    2.12	
	No. 6    2.50	
ダットン そば粉 100%	No. 1    4.33	4.82
	No. 2    5.42	
	No. 3    4.70	
高嶺ルビー そば粉 100%	No. 1    3.40	3.20
	No. 2    2.58	
	No. 3    3.61	
グレートルビー そば粉 100%	No. 1    2.39	2.67
	No. 2    2.92	
	No. 3    2.72	

表4B 各種そば粉のLo/Fo比測定の実データ (2回目測定)

各種そば粉の測定の実データ (2 回目)

Fagopyrum : そば配列コピー数の定量 PCR				
サンプルインフォメーション (そば粉)				
サンプル		Ct	コピー数	コピー数平均 (Fo copy)
白花 そば粉 100%	No. 1	14.3	2.90E+07	26,518,246
		14.5	2.40E+07	
	No. 2	14.7	2.10E+07	21,164,988
		14.7	2.10E+07	
	No. 3	14.1	3.30E+07	31,558,050
		14.2	3.00E+07	
	No. 4	14.6	2.30E+07	23,066,282
		14.6	2.30E+07	
	No. 5	14.1	3.20E+07	30,485,280
		14.2	2.90E+07	
	No. 6	14.5	2.50E+07	25,047,642
		14.5	2.50E+07	
ダッタン そば粉 100%	No. 1	15.1	1.70E+07	16,326,365
		15.2	1.60E+07	
	No. 2	15.4	1.40E+07	13,136,491
		15.5	1.30E+07	
	No. 3	15.0	1.70E+07	15,677,427
		15.3	1.40E+07	
高嶺ルビー そば粉 100%	No. 1	15.0	1.70E+07	16,998,440
		15.1	1.70E+07	
	No. 2	14.1	3.30E+07	30,135,004
		14.3	2.80E+07	
	No. 3	14.9	1.90E+07	18,706,756
		15.0	1.80E+07	
グレートルビー そば粉 100%	No. 1	14.1	3.20E+07	29,831,912
		14.3	2.80E+07	
	No. 2	14.5	2.40E+07	23,647,696
		14.6	2.30E+07	
	No. 3	14.4	2.60E+07	24,742,444
		14.6	2.30E+07	
サンプルインフォメーション (検量線用プラスミド)				
サンプル		Ct	コピー数	コピー数平均 (Fo copy)
10,000 copy		26.2	1.00E+04	10,000
		26.3	1.00E+04	
100,000 copy		22.8	1.00E+05	100,000
		22.6	1.00E+05	
1,000,000 copy		19.2	1.00E+06	1,000,000
		19.3	1.00E+06	
10,000,000 copy		15.7	1.00E+07	10,000,000
		15.7	1.00E+07	
100,000,000 copy		12.2	1.00E+08	100,000,000
		12.3	1.00E+08	
1,000,000,000 copy		9.2	1.00E+09	1,000,000,000
		9.2	1.00E+09	
テンプレートなし		45.0		
コントロール		45.0		

検量線

傾き : -3.43

相関係数 : 0.999

ベースライン : (1, 5)

Y切片 : 39.853

閾値ライン : 0.26

Limonium : スターチス配列コピー数の定量 PCR				
サンプルインフォメーション (そば粉)				
サンプル		Ct	コピー数	コピー数平均 (Lo copy)
白花 そば粉 100%	No. 1	15.9	5.90E+07	59,483,544
		15.9	6.00E+07	
	No. 2	16.1	5.10E+07	51,726,840
		16.1	5.30E+07	
	No. 3	15.7	6.70E+07	66,458,736
		15.8	6.50E+07	
	No. 4	15.9	6.00E+07	62,320,324
		15.8	6.40E+07	
	No. 5	15.8	6.60E+07	64,315,224
		15.8	6.30E+07	
	No. 6	15.8	6.30E+07	64,025,272
		15.8	6.50E+07	
ダッタン そば粉 100%	No. 1	15.7	6.60E+07	66,255,696
		15.7	6.60E+07	
	No. 2	15.6	7.10E+07	69,291,272
		15.7	6.80E+07	
	No. 3	15.5	7.50E+07	74,041,168
		15.6	7.30E+07	
高嶺ルビー そば粉 100%	No. 1	15.9	5.90E+07	62,179,320
		15.7	6.60E+07	
	No. 2	15.7	7.00E+07	72,273,880
		15.6	7.50E+07	
	No. 3	15.7	7.00E+07	72,066,528
		15.6	7.40E+07	
グレートルビー そば粉 100%	No. 1	15.6	7.30E+07	71,145,008
		15.7	6.90E+07	
	No. 2	15.7	6.80E+07	68,944,320
		15.7	7.00E+07	
	No. 3	15.6	7.10E+07	71,057,568
		15.6	7.10E+07	
サンプルインフォメーション (検量線用プラスミド)				
サンプル		Ct	コピー数	コピー数平均 (Lo copy)
10,000 copy		28.6	1.00E+04	10,000
		28.8	1.00E+04	
100,000 copy		25.4	1.00E+05	100,000
		25.6	1.00E+05	
1,000,000 copy		21.7	1.00E+06	1,000,000
		21.8	1.00E+06	
10,000,000 copy		18.4	1.00E+07	10,000,000
		18.4	1.00E+07	
100,000,000 copy		15.1	1.00E+08	100,000,000
		15.2	1.00E+08	
1,000,000,000 copy		11.8	1.00E+09	1,000,000,000
		11.8	1.00E+09	
テンプレートなし		45.0		0
コントロール		45.0		

検量線

傾き : -3.398

相関係数 : 0.999

ベースライン : (1, 5)

Y切片 : 42.303

閾値ライン : 1.02

表4B 各種そば粉のLo/Fo比測定の実データ（2回目測定）

各種そば粉の Lo/Fo 比 (2回目測定)		
サンプル	そば粉 100% の Lo/Fo 比	
	測定値	平均
白花 そば粉 100%	No. 1 2.24	2.36
	No. 2 2.44	
	No. 3 2.11	
	No. 4 2.70	
	No. 5 2.11	
	No. 6 2.56	
ダットン そば粉 100%	No. 1 4.06	4.69
	No. 2 5.27	
	No. 3 4.72	
高嶺ルビー そば粉 100%	No. 1 3.66	3.30
	No. 2 2.40	
	No. 3 3.85	
グレートルビー そば粉 100%	No. 1 2.38	2.72
	No. 2 2.92	
	No. 3 2.87	

白花そば粉に対して、最も測定値のずれが大きかったダットンそば粉でも約 2 倍であり、本方法は PCR による定量法としては十分な精度を有していると考えられる。

G. スターチス標準を添加した擬似混入試料から抽出した DNA 中の「ソバ配列のコピー数／スターチス配列のコピー数比」の算出と、擬似混入試料中のソバ混入量の計算

ソバ配列とスターチス配列の定量的 PCR 法は、実施例 1. の F. と G. に記載の方法で行なった。検量線をもとに、スターチス標準を添加した擬似混入試料から抽出した DNA 50ng 中のソバ配列のコピー数と、スターチス配列のコピー数を定量した。その定量値をもとに、「ソバ配列のコピー数／スターチス配列のコピー数=Fs/Ls 比」を算出した。なお、擬似混入試料の Fs/Ls 比は、同一サンプルから 3 点抽出、各点 2 ウェルで測定して

算出した。ここで算出した  $F_s/L_s$  比と、実施例 2. F. で算出した  $L_o/F_o$  比を用い、下式により、擬似混入試料 (1 g) 中のソバの混入量 ( $\mu\text{g}$ ) を求めた。

$$\text{ソバの混入量 ppm } (\mu\text{g/g}) = F_s/L_s \times L_o/F_o \times 1,000,000$$

$F_s/L_s$  比測定と混入量算出の結果、表 5 に示す通り、100ppm 白花ソバ粉/小麦の粉碎物、10ppm 白花ソバ粉/小麦の粉碎物、10ppm 白花ソバ粉/米の粉碎物、10ppm 白花ソバ粉/小麦と米の粉碎物について、2 回測定した結果ともに妥当な値を得ることができた。なお、各種擬似混入試料の  $F_s/L_s$  比を測定した時の生データを表 6A と表 6B に示す。

表 5 擬似混入試料中のそば混入量の測定結果まとめ (PCR)

擬似混入試料中のそば混入量の測定結果

擬似混入試料名		そば粉濃度 (ppm: $\mu\text{g/g}$ )	
		1回目測定	2回目測定
100ppm そば/小麦	No. 1	97.9	83.0
	No. 2	84.5	75.5
	No. 3	89.6	81.6
10ppm そば/小麦	No. 1	6.4	4.6
	No. 2	14.4	10.8
	No. 3	8.9	7.7
10ppm そば/米	No. 1	9.0 (参考値)	7.5
	No. 2	7.5	5.1
	No. 3	5.5 (参考値)	4.7
10ppm そば/米と小麦	No. 1	9.2	6.2
	No. 2	7.0	4.9
	No. 3	9.0	8.2

※ 各擬似混入試料から3点サンプリングして抽出、各点についてn=2で測定した。

※ 擬似混入試料5gにスターチス標準1gを添加して抽出したDNA 50ngをPCRに供した。

※ 擬似混入試料中のそば粉濃度(ppm)の算出には、白花そばの $L_o/F_o$ 値 = 2.36 を用いた。

※ 10ppm そば/米のNo.1, No. 3については、スターチス配列のコピー数定量において、検量線範囲外となったため、参考値として記載した。



表6A 各種擬似混入試料のそば混入量測定の実データ (1回目)

## 擬似混入試料の測定の実データ (1回目)

**Fagopyrum**: そば配列コピー数の定量 PCR  
サンプルインフォメーション (擬似混入試料)

サンプル	Ct	コピー数	コピー数平均 (Fs copy)
<b>100ppm</b> そば/小麦	No. 1	29.4 1.40E+03	<b>1,393</b>
		29.4 1.40E+03	
	No. 2	29.7 1.10E+03	<b>1,162</b>
		29.6 1.20E+03	
	No. 3	29.6 1.20E+03	<b>1,280</b>
		29.5 1.30E+03	
<b>10ppm</b> そば/小麦	No. 1	33.7 7.90E+01	<b>82</b>
		33.6 8.50E+01	
	No. 2	32.3 2.10E+02	<b>200</b>
		32.4 1.90E+02	
	No. 3	33.1 1.20E+02	<b>121</b>
		33.1 1.20E+02	
<b>10ppm</b> そば/米	No. 1	31.1 4.40E+02	<b>445</b>
		31.1 4.50E+02	
	No. 2	31.7 2.90E+02	<b>300</b>
		31.7 3.00E+02	
	No. 3	32.0 2.50E+02	<b>260</b>
		31.9 2.70E+02	
<b>10ppm</b> そば/米+小麦	No. 1	32.1 2.40E+02	<b>214</b>
		32.4 1.90E+02	
	No. 2	33.0 1.30E+02	<b>143</b>
		32.7 1.60E+02	
	No. 3	32.3 2.10E+02	<b>210</b>
		32.3 2.10E+02	

## サンプルインフォメーション (検量線用プラスミド)

サンプル	Ct	コピー数	コピー数平均 (Fs copy)
<b>10 copy</b>	37.2	1.00E+01	<b>10</b>
	37.3	1.00E+01	
<b>100 copy</b>	33.1	1.00E+02	<b>100</b>
	33.4	1.00E+02	
<b>1,000 copy</b>	29.7	1.00E+03	<b>1,000</b>
	29.7	1.00E+03	
<b>10,000 copy</b>	26.3	1.00E+04	<b>10,000</b>
	26.3	1.00E+04	
<b>100,000 copy</b>	22.9	1.00E+05	<b>100,000</b>
	22.8	1.00E+05	
<b>1,000,000 copy</b>	19.2	1.00E+06	<b>1,000,000</b>
	19.3	1.00E+06	
<b>10,000,000 copy</b>	15.7	1.00E+07	<b>10,000,000</b>
	15.7	1.00E+07	
<b>100,000,000 copy</b>	12.7	1.00E+08	<b>100,000,000</b>
	12.7	1.00E+08	
テンプレートなし	45.0		<b>0</b>
コントロール	45.0		

## 検量線

傾き: -3.504

Y切片: 40.394

相関係数: 0.999

閾値ライン: 0.26

ベースライン: (3, 10)

**Limonium**: スターチ配列コピー数の定量 PCR  
サンプルインフォメーション (擬似混入試料)

サンプル	Ct	コピー数	コピー数平均 (Ls copy)
<b>100ppm</b> そば/小麦	No. 1	14.6 3.40E+07	<b>33,597,292</b>
		14.6 3.30E+07	
	No. 2	14.7 3.20E+07	<b>32,452,070</b>
		14.6 3.30E+07	
	No. 3	14.6 3.40E+07	<b>33,721,376</b>
		14.6 3.30E+07	
<b>10ppm</b> そば/小麦	No. 1	14.7 3.00E+07	<b>30,161,998</b>
		14.8 3.00E+07	
	No. 2	14.6 3.30E+07	<b>32,846,720</b>
		14.6 3.20E+07	
	No. 3	14.6 3.20E+07	<b>31,901,436</b>
		14.7 3.10E+07	
<b>10ppm</b> そば/米	No. 1	12.8 1.10E+08	<b>116,638,192</b>
		12.7 1.20E+08	
	No. 2	13.1 9.40E+07	<b>94,101,296</b>
		13.1 9.40E+07	
	No. 3	12.8 1.10E+08	<b>112,316,848</b>
		12.8 1.10E+08	
<b>10ppm</b> そば/米+小麦	No. 1	13.9 5.50E+07	<b>54,842,760</b>
		13.9 5.50E+07	
	No. 2	14.1 4.70E+07	<b>48,308,684</b>
		14.0 4.90E+07	
	No. 3	13.8 5.70E+07	<b>55,342,960</b>
		13.9 5.40E+07	

## サンプルインフォメーション (検量線用プラスミド)

サンプル	Ct	コピー数	コピー数平均 (Ls copy)
<b>10 copy</b>	36.7	1.00E+01	<b>10</b>
	36.6	1.00E+01	
<b>100 copy</b>	33.2	1.00E+02	<b>100</b>
	33.4	1.00E+02	
<b>1,000 copy</b>	29.8	1.00E+03	<b>1,000</b>
	29.8	1.00E+03	
<b>10,000 copy</b>	26.7	1.00E+04	<b>10,000</b>
	27.1	1.00E+04	
<b>100,000 copy</b>	23.1	1.00E+05	<b>100,000</b>
	23.0	1.00E+05	
<b>1,000,000 copy</b>	19.6	1.00E+06	<b>1,000,000</b>
	19.8	1.00E+06	
<b>10,000,000 copy</b>	16.2	1.00E+07	<b>10,000,000</b>
	16.2	1.00E+07	
<b>100,000,000 copy</b>	13.1	1.00E+08	<b>100,000,000</b>
	13.2	1.00E+08	
テンプレートなし	45.0		<b>0</b>
コントロール	45.0		

## 検量線

傾き: -3.382

Y切片: 40.043

相関係数: 0.999

閾値ライン: 0.26

ベースライン: (3, 10)

表6A 各種擬似混入試料のそば混入量測定の実データ (1回目)

そば混入量の算出結果		そば混入量 (ppm: $\mu\text{g/g}$ )	
サンプル	Fs/Ls	Fo/Lo = 2.36	
<b>100ppm</b> そば/小麦	No. 1 4.1E-05	<b>97.9 ppm</b>	
	No. 2 3.6E-05	<b>84.5 ppm</b>	
	No. 3 3.8E-05	<b>89.6 ppm</b>	
<b>10ppm</b> そば/小麦	No. 1 2.7E-06	<b>6.4 ppm</b>	
	No. 2 6.1E-06	<b>14.4 ppm</b>	
	No. 3 3.8E-06	<b>8.9 ppm</b>	
<b>10ppm</b> そば/米	No. 1 3.8E-06	<b>9.0 ppm (参考)</b>	
	No. 2 3.2E-06	<b>7.5 ppm</b>	
	No. 3 2.3E-06	<b>5.5 ppm (参考)</b>	
<b>10ppm</b> そば/米+小麦	No. 1 3.9E-06	<b>9.2 ppm</b>	
	No. 2 3.0E-06	<b>7.0 ppm</b>	
	No. 3 3.8E-06	<b>9.0 ppm</b>	

※ 10ppmそば/米の擬似混入試料については、スターチス  
 ※ 配列のコピー数が検量線範囲を超えたため、参考値とした。

表6B 各種擬似混入試料のそば混入量測定の実データ (2回目)

擬似混入試料の測定の実データ (2 回目)

**Fagopyrum**: そば配列コピー数の定量 PCR  
サンプルインフォメーション (擬似混入試料)

サンプル		Ct	コピー数	コピー数平均 (Fs copy)
100ppm そば / 小麦	No. 1	30.8	1.20E+03	1,180
		30.8	1.20E+03	
	No. 2	31.1	9.40E+02	1,018
		30.9	1.10E+03	
	No. 3	30.9	1.10E+03	1,143
		30.8	1.20E+03	
10ppm そば / 小麦	No. 1	35.2	6.20E+01	58
		35.4	5.40E+01	
	No. 2	34.1	1.30E+02	148
		33.7	1.70E+02	
	No. 3	34.6	9.20E+01	108
		34.2	1.20E+02	
10ppm そば / 米	No. 1	32.4	4.00E+02	423
		32.3	4.40E+02	
	No. 2	33.1	2.50E+02	231
		33.4	2.10E+02	
	No. 3	33.3	2.20E+02	249
		33.0	2.80E+02	
10ppm そば / 米 + 小麦	No. 1	33.7	1.70E+02	147
		34.1	1.30E+02	
	No. 2	34.5	9.80E+01	109
		34.2	1.20E+02	
	No. 3	33.3	2.20E+02	209
		33.5	2.00E+02	

## サンプルインフォメーション (検量線用プラスミド)

サンプル		Ct	コピー数	コピー数平均 (Fs copy)
10 copy		38.0	1.00E+01	10
		38.1	1.00E+01	
100 copy		35.1	1.00E+02	100
		34.2	1.00E+02	
1,000 copy		31.0	1.00E+03	1,000
		31.2	1.00E+03	
10,000 copy		27.5	1.00E+04	10,000
		27.5	1.00E+04	
100,000 copy		24.0	1.00E+05	100,000
		24.0	1.00E+05	
1,000,000 copy		20.4	1.00E+06	1,000,000
		20.4	1.00E+06	
10,000,000 copy		16.9	1.00E+07	10,000,000
		16.9	1.00E+07	
100,000,000 copy		13.6	1.00E+08	100,000,000
		13.7	1.00E+08	
1,000,000,000 copy		10.5	1.00E+09	1,000,000,000
		10.6	1.00E+09	
テンプレートなし		45.0		0
コントロール		45.0		

検量線

傾き : -3.475

相関係数 : 0.999

ベースライン : (3, 8)

Y切片 : 41.45

閾値ライン : 0.51

**Limonium**: スターチス配列コピー数の定量 PCR  
サンプルインフォメーション (擬似混入試料)

サンプル		Ct	コピー数	コピー数平均 (Ls copy)
100ppm そば / 小麦	No. 1	16.4	3.40E+07	33,560,780
		16.4	3.30E+07	
	No. 2	16.5	3.10E+07	31,837,948
		16.4	3.20E+07	
	No. 3	16.4	3.30E+07	33,067,796
		16.4	3.30E+07	
10ppm そば / 小麦	No. 1	16.6	3.00E+07	29,930,496
		16.5	3.00E+07	
	No. 2	16.4	3.30E+07	32,418,082
		16.5	3.20E+07	
	No. 3	16.4	3.30E+07	32,839,880
		16.4	3.30E+07	
10ppm そば / 米	No. 1	14.4	1.30E+08	133,923,120
		14.3	1.40E+08	
	No. 2	14.7	1.10E+08	107,428,504
		14.7	1.10E+08	
	No. 3	14.4	1.30E+08	125,724,392
		14.4	1.30E+08	
10ppm そば / 米 + 小麦	No. 1	15.6	5.60E+07	56,432,404
		15.6	5.70E+07	
	No. 2	15.7	5.20E+07	52,445,608
		15.7	5.30E+07	
	No. 3	15.5	5.90E+07	60,105,248
		15.5	6.10E+07	

## サンプルインフォメーション (検量線用プラスミド)

サンプル		Ct	コピー数	コピー数平均 (Ls copy)
100 copy		35.2	1.00E+02	100
		35.3	1.00E+02	
1,000 copy		31.5	1.00E+03	1,000
		31.6	1.00E+03	
10,000 copy		28.4	1.00E+04	10,000
		28.6	1.00E+04	
100,000 copy		24.7	1.00E+05	100,000
		24.9	1.00E+05	
1,000,000 copy		21.5	1.00E+06	1,000,000
		21.6	1.00E+06	
10,000,000 copy		17.9	1.00E+07	10,000,000
		17.9	1.00E+07	
100,000,000 copy		14.7	1.00E+08	100,000,000
		14.8	1.00E+08	
1,000,000,000 copy		11.6	1.00E+09	1,000,000,000
		11.6	1.00E+09	
テンプレートなし		45.0		0
コントロール		45.0		

検量線

傾き : -3.385

相関係数 : 0.999

ベースライン : (3, 8)

Y切片 : 41.855

閾値ライン : 0.77

表6B 各種擬似混入試料のそば混入量測定の実データ (2回目)

そば混入量の算出結果		そば混入量 (ppm: $\mu\text{g/g}$ )	
サンプル	Fs/Ls	Fo/Lo = 2.36	
<b>100ppm</b> そば / 小麦	No. 1 3.5E-05	83.0 ppm	
	No. 2 3.2E-05	75.5 ppm	
	No. 3 3.5E-05	81.6 ppm	
<b>10ppm</b> そば / 小麦	No. 1 1.9E-06	4.6 ppm	
	No. 2 4.6E-06	10.8 ppm	
	No. 3 3.3E-06	7.7 ppm	
<b>10ppm</b> そば / 米	No. 1 3.2E-06	7.5 ppm	
	No. 2 2.2E-06	5.1 ppm	
	No. 3 2.0E-06	4.7 ppm	
<b>10ppm</b> そば / 米 + 小麦	No. 1 2.6E-06	6.2 ppm	
	No. 2 2.1E-06	4.9 ppm	
	No. 3 3.5E-06	8.2 ppm	

### 実施例 3

#### A. DNA 抽出に用いた植物試料

##### (1) 落花生、ソバ（白花ソバ）、スターチスの種子：

実施例 1. A. (1)、(2) と同じものを用いた。

##### (2) 小麦、大豆、とうもろこしの葉：

実施例 1. A. (3) と同じものを用いた。

##### (3) 小豆、アーモンド、クルミ、マカデミアナッツ、ヘーゼルナッツの種子と、松の実、ヒマワリの種、ケシの実、ごま、リンゴ：

市販品を用いた。

##### (4) ソバ（白花ソバ）、小豆の葉

市販品の種子から発芽させた葉を用いた。

#### B. DNA 抽出

##### (1) スターチスの種子からの DNA 抽出

実施例 1. B. (2) と同じ方法で行なった。

##### (2) 落花生、アーモンド、ヘーゼルナッツの種子と、ケシの実、ゴマからの DNA 抽出：

実施例 1. B. (3) と同じ方法で行なった。

##### (3) ソバ（白花ソバ）、小麦、大豆、とうもろこし、小豆の葉と、リンゴの種子からの DNA 抽出：

実施例 1. B. (4) と同じ方法で行なった。

##### (4) マカデミアナッツの種子からの DNA 抽出：

QIAGEN Genomic DNA Handbook を参考にして、QIAGEN 社製の Genomic-tip を用い、以下の方法で行った。

細かく粉碎した試料 1g を 50ml 容チューブに入れ、10ml のバッファー G2、200  $\mu$ l の Proteinase K (20mg/ml)、20  $\mu$ l の RNase A (100mg/ml) を加え、混合した後、50℃で 1 時間保温した。その後、約 3,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離し、その上清液を得た。さらに上清液の油分や粉末を取り除き、約 3,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離し、その上清液を得た。得られた上清液を、予め 1ml のバッファー QBT で平衡化した Genomic-tip 20/G に供して DNA を Column に吸着させた。その後、4ml のバッファー QC で Column を洗浄し、予め 50℃に加温してある 1ml のバッファー QF で溶出し、イソプロパノール沈澱により回

収した沈殿物を 100  $\mu$ l の滅菌超純水に溶解した。溶液中の DNA 濃度を測定し、適宜滅菌超純水で希釈したものを PCR の鋳型 DNA 試料とした。

#### (5) クルミの種子と、松の実、ヒマワリの種からの DNA 抽出：

DNeasy Plant Maxi Kit Handbook を参考にして、QIAGEN 社製の DNeasy Plant Maxi Kit を用い、以下の方法で行なった。

細かく粉碎した試料 1g を 15ml 容チューブに入れ、10ml のバッファー AP1、10  $\mu$ l の RNase A (100mg/ml) を加え、混合した後、65℃で 60 分間保温した。その後、約 3,000  $\times$ g で 10 分間遠心分離し、その上清液を得た。これに 1.5ml のバッファー AP2 を加えて、水中で 10 分間放置し、遠心分離によりその上清液を得た。得られた上清を QIAshredder Spin Column に供し、遠心分離により Column のパス液を得た。このパス液に 1.5 容量のバッファー AP3、1 容量のエタノールを加えて混合した後、DNeasy Spin Column に供し、約 1,500  $\times$ g で 1 分間遠心分離して DNA を Column に吸着させた。その後、Column に 10ml のバッファー AW を加え、約 1,500  $\times$ g で 1 分間遠心分離して Column を洗浄、再度 10ml のバッファー AW を Column に加え、約 1,500  $\times$ g で 1 分間遠心分離して、最後に約 3,000  $\times$ g で 10 分間遠心分離して Columnに残っているバッファー AW を完全に除去した。最終的に 65℃で予め保温しておいた 1ml の滅菌超純水を Column に加え、5 分間静置した後に、約 3,000  $\times$ g で 5 分間遠心分離して Column から溶出し、イソプロパノール沈殿により回収した沈殿物を 100  $\mu$ l の滅菌超純水に溶解した。溶液中の DNA 濃度を測定し、適宜滅菌超純水で希釈したものを PCR の鋳型 DNA 試料とした。

### C. 落花生の ITS-1 配列の一部を検出する PCR

#### (1) 落花生検出用プライマー：

プライマー配列には、落花生属に属する植物の GenBank に登録されている以下の 11 配列中の ITS-1 配列に共通な配列を用いた。なお、このうちの *Arachis hypogaea* については、GenBank に登録されている *Arachis hypogaea* (AF156675) の代わりとして、市販落花生を解析して得た配列も用いた。

1 : *Arachis batizocoi* (AF203553)

2 : *Arachis correntina* (AF203554)

3 : *Arachis hermannii* (AF203556)

4 : *Arachis hoehnei* (AJ320395)

5 : *Arachis hypogaea* (AF156675 及び、市販落花生を解析して得た配列)

6 : *Arachis magna* (AF203555)

7 : *Arachis major* (AF203552)

8 : *Arachis palustris* (AF203557)

9 : *Arachis pinto* (AF203551)

10 : *Arachis triseminata* (AF204233)

11 : *Arachis villosa* (AF203558)

そして、下記配列のオリゴ DNA プライマー (株式会社 QIAGEN 社製 OPC 精製品) を合成して、落花生 ITS-1 配列の一部を検出する PCR (以下、落花生 PCR とする) 用プライマーとして使用した。

5' - GCG GAA AGC GCC AAG GAA GC - 3' (配列番号 2 1)

5' - GTC GCC CCG ACC GGA TG - 3' (配列番号 6 6)

5' - CGT CGC CCC GAC CGG AT - 3' (配列番号 2 6)

5' - TCG TCG CCC CGA CCG GAT G - 3' (配列番号 6 5)

## (2) 落花生検出用プライマーの特異性 (PCR シミュレーション) :

PCR シミュレーションソフト Amplify 1.0 (Bill Engels) により、落花生属に属する植物の 11 配列、落花生以外のアレルギーを起こす恐れのある植物の 8 配列 (ソバ、小麦、大豆、クルミ、松茸、桃、リンゴ、オレンジ)、食品原材料としてよく使われている植物の 8 配列 (とうもろこし、米、胡椒、カラシ、ニンジン、椎茸、白菜、かぶ)、マメ科植物の 6 配列 (インゲンマメ、ライマメ、ヒラマメ、ヒヨコマメ、緑豆、小豆)、落花生近縁種の植物の 69 配列、スターチスから、落花生検出用プライマーで PCR 増幅産物が得られるシミュレーション結果となるかを確認した。ここでいう落花生近縁種の植物とは、GenBank に登録されている落花生 *Arachis hypogaea* の塩基配列 (AF156675) の ITS-1 配列部分を BLAST ホモロジー検索に供して、Score 60 bits 以上となった落花生属以外の植物のことである。今回は、さらにその植物が属する属の中で最も Score が高い値となった種の配列を、その属の代表の配列として選定した。なお、PCR シミュレーションはそれら配列の ITS-1~5.8S rRNA 遺伝子~ITS-2 配列の領域に対して行った。配列番号 2 1 と配列番号 6 5 のプライマーを組み合わせ使用した場合について、シミュレーションに用いた配列の GenBank Accession Number ならびに、シミュレーション結果を表 7 A

～ 7 E に代表として示す。表 7 A ～ 7 E の省略文字、記号は以下に示す通りである：

\*：標的サイズ付近（±10bp）の PCR 増幅産物が得られると予想されたもの

W 値：PCR 増幅産物の得られる可能性

得られる可能性が高い…W6>W 5>W 4>W 3>W 2…得られる可能性が低い

数値（bp）：PCR 増幅産物のサイズ（bp）

Amplify で得られた値から 2 を引いた値

—：PCR 増幅産物なしと予想されたもの



表 7A

落花生検出用プライマー(配列番号 21 & 配列番号 65):増幅産物							
学名 (一般名)		GenBank Accession No.	W6	W5	W4	W3	W2
落花生属	★ <i>Arachis batizocoi</i>	AF203553	76bp	—	—	—	—
	★ <i>Arachis correntina</i>	AF203554	76bp	—	—	—	—
	★ <i>Arachis hermannii</i>	AF203556	76bp	—	—	—	—
	★ <i>Arachis hoehnei</i>	AJ320395	76bp	—	—	—	—
	★ <i>Arachis hypogaea</i> (市販落花生)	—	76bp	—	—	—	—
	★ <i>Arachis magna</i>	AF203555	76bp	—	—	—	—
	★ <i>Arachis major</i>	AF203552	76bp	—	—	—	—
	★ <i>Arachis palustris</i>	AF203557	76bp	—	—	—	—
	★ <i>Arachis pintoi</i>	AF203551	76bp	—	—	—	—
	★ <i>Arachis triseminata</i>	AF204233	76bp	—	—	—	—
	★ <i>Arachis villosa</i>	AF203558	76bp	—	—	—	—
落花生近縁種の植物	<i>Stylosanthes acuminata</i>	AJ320282	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes angustifolia</i>	AJ320284	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes aurea</i>	AJ320285	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes biflora</i>	AJ320289	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes bracteata</i>	AJ320346	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes calcicola</i>	AJ320348	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes campestris</i>	AJ320291	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes capitata</i>	AJ320350	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes cayennensis</i>	AJ320292	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes erecta</i>	AJ320352	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes fruticosa</i>	AJ320356	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes gracilis</i>	AJ320296	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes grandifolia</i>	AJ320299	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes guianensis</i> <i>subsp. dissitiflora</i>	AJ320301	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes hamata</i>	AJ320365	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes hippocampoides</i>	AJ320317	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes hispida</i>	AJ320328	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes humilis</i>	AJ320323	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes ingrata</i>	AJ320329	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes leiocarpa</i>	AJ320332	—	—	—	—	—

表 7B

落花生検出用プライマー(配列番号 21 & 配列番号 65):増幅産物							
学名 (一般名)		GenBank Accession No.	W6	W5	W4	W3	W2
落花生近縁種の植物	<i>Stylosanthes linearifolia</i>	AJ320367	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes macrocarpa</i>	AJ320369	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes macrocephala</i>	AJ320371	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes macrosoma</i>	AJ320333	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes mexicana</i>	AJ320374	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes montevidensis</i>	AJ320336	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes pilosa</i>	AJ320377	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes scabra</i>	AJ320382	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes seabrana</i>	AJ320384	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes sericeiceps</i>	AJ320386	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes subsericea</i>	AJ320387	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes sundaica</i>	AJ320389	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes sympodialis</i>	AJ320391	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes tomentosa</i>	AJ320337	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes tuberculata</i>	AJ320392	—	—	—	—	—
	<i>Stylosanthes viscosa</i>	AJ320340	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpum bernierianum</i>	AF189036	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpum coeruleum</i>	AF189037	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpum drakei</i>	AF189039	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpum flavum</i>	AF189041	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpum keniense</i>	AF068155	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpum kirkii</i>	AF068152	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpum klainei</i>	AF189044	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpum megalophyllum</i>	AF068154	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpum muricatum</i>	AF068156	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpum orientale</i>	AF068159	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpum pubescens</i>	AF189045	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpum rectangulare</i>	AF189046	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpum schliebenii</i>	AF189047	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpum sennoides</i>	AF068153	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpum somalense</i>	AF189048	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpum trachycarpum</i>	AF189049	—	—	—	—	—

表 7C

落花生検出用プライマー(配列番号 21 & 配列番号 65):増幅産物							
学名 (一般名)		GenBank Accession No.	W6	W5	W4	W3	W2
落花生近縁種の植物	<i>Ormocarpum trichocarpum</i>	AF068158	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpum verrucosum</i>	AF189050	—	—	—	—	—
	<i>Chapmannia floridana</i>	AF203543	—	—	—	—	—
	<i>Chapmannia prismatica</i>	AJ320400	—	—	—	—	—
	<i>Chapmannia somalensis</i>	AF203544	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpopsis aspera</i>	AF068148	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpopsis calcicola</i>	AF068145	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpopsis itremoensis</i>	AF068149	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpopsis mandrarensis</i>	AF068147	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpopsis parvifolia</i>	AF068144	—	—	—	—	—
	<i>Ormocarpopsis tulearensis</i>	AF068146	—	—	—	—	—
	<i>Diphysa humilis</i>	AF068162	—	—	—	—	—
	<i>Diphysa macrophylla</i>	AF189029	—	—	—	—	—
	<i>Diphysa suberosa</i>	AF189034	—	—	—	—	—
	<i>Spigelia coelostylioides</i>	AF177992	—	—	—	—	—
	<i>Spigelia hedyotideia</i>	AF178005	—	—	—	—	—
	<i>Spigelia marilandica</i>	AF177991	—	—	—	—	—
食用マメ科植物	<i>Phaseolus vulgaris</i> (いんげん豆)	AF069128, AF115161 ~ AF115163, AF115169	—	—	—	—	—
	<i>Cicer arietinum</i> (ひよこ豆)	AJ237698	—	—	—	—	—
	<i>Lens culinaris subsp. culinaris</i> (ひら豆)	AF228065, AF228066, AJ404739	—	—	—	—	—
	<i>Phaseolus lunatus</i> (らい豆)	AF069129, AF115171, AF115175	—	—	—	—	—
	<i>Vigna angularis var. nipponensis</i> (小豆)	AB059747	—	—	—	—	—
	<i>Vigna radiate</i> (緑豆)	X14337, AB059848	—	—	—	—	—

表 7D

落花生検出用プライマー(配列番号 21 & 配列番号 65):増幅産物							
学名 (一般名)		GenBank Accession No.	W6	W5	W4	W3	W2
アレルギー 特定原材料	<i>Fagopyrum_esculentum</i> (白花そば)	AB000330, AB000331	—	—	—	—	—
	<i>Triticum aestivum</i> (小麦)	Z11761, AJ301799	—	—	—	—	—
	<i>Glycine max</i> (大豆)	AJ011337, U60551	—	—	—	—	—
	<i>Juglans regia</i> (クルミ)	AF303809, AF179581	—	—	—	—	—
	<i>Tricholoma matsutake</i> (松茸)	U62964, AF385751	—	—	—	—	—
	<i>Prunus persica</i> (桃)	AF31874, AF143535, AF179562, AF185621	—	—	—	—	—
	<i>Malus x domestica</i> (リンゴ)	AF186477	—	—	423bp, 466bp, 238bp	—	—
	<i>Malus x domestica</i> (リンゴ)	AF186478	—	—	238bp, 155bp	—	—
	<i>Malus x domestica</i> (リンゴ)	AF186479	—	—	238bp, 112bp, 155bp	—	—
	<i>Citrus sp.</i> (パレンシアオレンジ)	E08821	—	—	—	—	—

表 7E

落花生検出用プライマー(配列番号 21 & 配列番号 65):増幅産物							
学名 (一般名)		GenBank Accession No.	W6	W5	W4	W3	W2
主要食品原料	<i>Zea mays</i> (とうもろこし)	U46600～ U46648	—	—	—	—	—
	<i>Oryza sativa</i> (米)	AF169230	—	—	—	—	—
	<i>Piper nigrum</i> (胡椒)	AF275197, AF275198	—	—	—	—	—
	<i>Sinapis alba</i> (白からし)	X15915, AF128106	—	—	—	—	—
	<i>Brassica nigra</i> (黒からし)	AF128102, AF128103	—	—	—	—	—
	<i>Brassica juncea</i> (和からし)	AF128093	—	—	—	—	—
	<i>Brassica rapa subsp. rapa</i> (かぶ)	AF128097	—	—	—	—	—
	<i>Brassica chinensis</i> (白菜)	AF128098	—	—	—	—	—
	<i>Lentinula edodes</i> (しいたけ)	AF079572	—	—	—	—	—
	<i>Daucus carota</i> (人参)	X17534	—	—	—	—	—
標準	<i>Limonium sinuatum</i> (スターチス)	AJ222860	—	—	—	—	—

シミュレーションの結果、配列番号 21 と配列番号 65 のプライマーを組み合わせで使用した場合、表 7A～7C に示す通り、落花生属の 11 配列からは標的とした 76bp のサイズの PCR 増幅産物が得られることが予想された。また、落花生属以外のアレルギーを起こす恐れのある植物の 7 配列 (ソバ、小麦、大豆、クルミ、松茸、桃、オレンジ)、食品原材料としてよく使われている植物の 8 配列 (とうもろこし、米、胡椒、カラシ、ニンジン、椎茸、白菜、かぶ)、マメ科植物の 6 配列 (インゲンマメ、ライマメ、ヒラマメ、ヒヨコマメ、緑豆、小豆)、落花生近縁種の植物の 69 配列、スターチスからは、標的サイズの PCR 増幅産物ならびに非特異的な PCR 増幅産物は得られないことが予想された。なお、リンゴからは、弱いながら標的とは異なるサイズの非特異的な PCR 増幅産物が得られる可能性があることが予想されたため、別途、実際の PCR で確認することとした。なお、配列番号 21 と配列番号 66 に示す配列を有するプライマーを組み合わせで使用

した場合、配列番号 21 と配列番号 26 のプライマーを組み合わせて使用した場合にも、落花生属の配列から標的とする PCR 増幅産物が得られることが予想される結果が得られた。

### (3) 落花生 PCR :

QIAGEN 社製の HotStarTaq Master Mix Kit を用い、以下の方法で行った。

12.5  $\mu$ l の 2×HotStartTaq Master Mix (HotStar Taq DNA Polymerase、PCR バッファー with 3mM MgCl<sub>2</sub>、400  $\mu$ M each dNTP) に、プライマーをそれぞれ終濃度で 0.2  $\mu$ M ずつ、及び鋳型 DNA を加え、最終的に滅菌超純水で 25  $\mu$ l とした反応用溶液を 0.2ml マイクロチューブに入れ、Applied Biosystems 社製のサーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9600 により、95℃、15 分 (酵素活性化) の後、95℃、30 秒 (変性)、68℃、30 秒 (アニーリング、伸長) のサイクルを 45 回繰り返した後、72℃、4 分 (最終伸長) として反応させた。得られた PCR 反応液をエチジウムブロマイド含有の 2% アガロースゲル電気泳動に供して、Amersham Biosciences 株式会社製の蛍光イメージアナライザー FluorImager 595 により解析した。配列番号 21 と配列番号 65 とのプライマーを組み合わせて使用した場合の結果を図 12 に代表として示す。図 12 の省略文字、記号などは以下に示す。

M : 100bp DNA Ladder Marker

(-) : 鋳型 DNA 未添加

数字 : 添加した鋳型 DNA 量

矢印 : 標的の PCR 増幅産物のバンド (約 76bp)

なお、抽出した植物 DNA が PCR 増幅可能なレベルの純度であることは、植物 chloroplast DNA や Rubisco 遺伝子配列の一部を増幅するプライマーにより、PCR 増幅産物が得られることで確認した (データ省略)。

### (4) 落花生 PCR の感度と特異性 :

落花生 PCR の結果、図 12 に示す通り、落花生 DNA 500fg から標的とした落花生 ITS-1 配列から予想される約 76bp のサイズの PCR 増幅産物が得られた。500fg の落花生 DNA を検出できる感度とは、ある試料から抽出した DNA 50ng を鋳型として PCR した場合、その

試料 DNA 中に含まれる 10ppm のソバ DNA を検出できるレベルの感度に相当する。

落花生 PCR の結果、図 1 2 に示す通り、リンゴの種子、小麦の葉、ソバの葉、小豆の葉、大豆の葉、とうもろこしの葉、スターチスの種子 DNA 50ng からは標的サイズの PCR 増幅産物ならびに非特異的な PCR 増幅産物は得られなかった。リンゴについては、PCR シミュレーションで弱いながら標的とは異なるサイズの非特異的な PCR 増幅産物が得られる可能性があることが予想されていたが、問題はないことが確認できた。また、アーモンド、ヘーゼルナッツ、マカデミアナッツ、クルミの種子、ケシの実、松の実、ヒマワリの種、ゴマ、サケ精子 DNA から同様に PCR 増幅産物は得られないことを確認した（データ省略）。他にも、配列番号 2 1 と配列番号 6 6 のプライマーを組み合わせ使用した場合、配列番号 2 1 と配列番号 2 6 のプライマーを組み合わせ使用した場合、ともに、同様の感度と特異性を有するという結果を得た（データ省略）。

#### （５）落花生 PCR 増幅産物の塩基配列解析：

上記配列番号 2 1 と配列番号 6 5 のプライマーを組み合わせ使用した場合に得られた落花生 DNA 由来の PCR 増幅産物の塩基配列は、配列番号 2 1 と配列番号 6 5 のプライマーを用いた両鎖ダイレクトシーケンスにより解析した。得られた塩基配列を、市販落花生 *Arachis hypogaea* の塩基配列と比較し、落花生 DNA 由来の PCR 増幅産物の塩基配列は、市販落花生（*Arachis hypogaea*）の塩基配列の標的とした部分と 100% 合致することを確認した。（データ省略）このことから、上記プライマーを用いた PCR により、落花生 ITS-1 の一部の配列を増幅、検出していることが立証された。他にも、配列番号 2 1 と配列番号 6 6 のプライマーを組み合わせ使用した場合、配列番号 2 1 と配列番号 2 6 とのプライマーを組み合わせ使用した場合、ともに、同様に落花生 ITS-1 の一部の配列を増幅、検出しているという結果を得た。（データ省略）

以上の結果より、上記プライマーを用いた落花生 PCR により、落花生属に属する植物全般の ITS-1 配列を、高感度かつ、特異的に検出できることが明らかとなった。これらプライマーを、落花生 ITS-1 配列のコピー数を定量する PCR（以下、落花生配列の定量的 PCR 法とする）に用いることとした。

#### D. 落花生配列のコピー数を定量する PCR

##### （１）落花生配列の検出用 TaqMan MGB プローブ：

下記配列の TaqMan MGB プローブ（Applied Biosystems Japan 株式会社製 リポーター

色素 FAM) を合成して、落花生配列の検出用プローブとして使用した。なお、プローブ配列には、落花生属に属する植物の ITS-1 配列として GenBank に登録されている 11 配列、ならびに市販落花生を解析して得た配列に共通な配列を用いた。

5' -TGC TCT CCC CGC CGG C-3' (配列番号 3 4)

#### (2) 落花生配列の定量的 PCR 法:

QIAGEN 社製の QuantiTect Probe PCR Kit を用い、以下の方法で行った。

12.5  $\mu$ l の 2 $\times$ QuantiTect Probe PCR Master Mix に、プライマーを終濃度でそれぞれ 0.2  $\mu$ M ずつと、配列番号 3 4 の TaqMan MGB プローブを終濃度で 0.1  $\mu$ M、及び鋳型 DNA を加え、最終的に滅菌超純水で 25  $\mu$ l とした溶液を 96 穴 PCR プレートに分注した。分注した 96 穴 PCR プレートを、Applied Biosystems 社製の Real Time PCR 装置 Sequence Detection System 7700 にセットし、95 $^{\circ}$ C, 15 分の後、95 $^{\circ}$ C, 30 秒 (変性)、68 $^{\circ}$ C, 30 秒 (アニーリング、伸長) のサイクルを 45 回繰り返した後、72 $^{\circ}$ C, 4 分 (最終伸長) として反応させた。反応は全て同一試料を 2 ウェル並行で行なった。反応終了後、伸長ステップにおける蛍光データを解析した。なお、ベースラインは、始めに 0-1 サイクルに設定して蛍光の立ち上がりの始まるサイクルを確認して、そのサイクルよりも前の範囲で適宜設定した。また、閾値ライン (Threshold Line) の設定は、Kuribara H et al. 2002. Novel Reference Molecules for Quantitation of Genetically Modified Maize and Soybean. Journal of AOAC International 85: 1077-1089 に記載の方法に従って行なった。配列番号 2 1 と配列番号 6 5 とのプライマーを組み合わせ使用した場合の結果を図 1 3、図 1 4、図 1 5 に代表として示す。

なお、抽出した植物 DNA が PCR 増幅可能なレベルの純度であることは、植物 chloroplast DNA や Rubisco 遺伝子配列の一部を増幅するプライマーにより、PCR 増幅産物が得られることで確認した (データ省略)。

#### (3) 落花生配列の定量的 PCR 法の特異性:

落花生配列の定量的 PCR 法の結果、図 1 3 に示す通り、落花生の種子 DNA から増幅を示す蛍光シグナルの立ち上がりが確認された。一方、リンゴの種子、小麦の葉、ソバの葉、小豆の葉、大豆の葉、とうもろこしの葉、スターチスの種子 DNA 50ng からは増幅を示す蛍光シグナルの立上がりは認められなかった。また、アーモンド、ヘーゼルナッツ、マカデミアナッツ、クルミの種子、ケシの実、松の実、ヒマワリの種、ゴマ、リンゴ、



サケ精子 DNA から増幅を示す蛍光シグナルの立上がりは認められなかった。(データ省略)他にも、配列番号 2 1 と配列番号 6 6 とのプライマーを組み合わせ使用した場合、配列番号 2 1 と配列番号 2 6 と組み合わせ使用した場合、ともに、同様の特異性を有するという結果を得た。(データ省略)

#### (4) 落花生配列の定量的 PCR 法の定量性と感度：

ソバ配列の定量的 PCR 法の結果、図 1 4 と図 1 5 に示す通り、落花生 DNA 50ng~500fg の範囲で、相関係数 0.996、かつ傾き-3.911 の検量線を引くことができる定量性と感度を確認できた。また、落花生 DNA 50fg から増幅を示す蛍光シグナルの立ち上がりが見られる感度を確認できた。他にも、配列番号 2 1 と配列番号 6 6 のプライマーを組み合わせ使用した場合、配列番号 2 1 と配列番号 2 6 を組み合わせ使用した場合、ともに、同様の定量性と感度を有するという結果を得た。(データ省略)

以上の結果より、配列番号 2 1 と配列番号 6 5 のプライマー、配列番号 3 4 のプローブを用いた落花生配列の定量的 PCR 法、配列番号 2 1 と配列番号 6 6 とのプライマー、配列番号 3 4 のプローブを用いた落花生配列の定量的 PCR 法、配列番号 2 1 と配列番号 2 6 とのプライマー、配列番号 3 4 のプローブを用いた落花生配列の定量的 PCR 法により、落花生属に属する植物全般の ITS-1 配列を高感度かつ特異的に検出し、さらには落花生の標的配列を含む検量線用プラスミドを構築して検量線を作製すれば、落花生配列のコピー数を定量できることが明らかとなった。本落花生配列の定量的 PCR 法と補正用のスターチス配列の定量的 PCR 法と組合わせて、落花生の混入量測定に用いることができる。

#### 実施例 4：加工処理後のサンプル中の定量的 PCR 法の定量性の確認：

さらに、加熱調理した加工品モデルとして、100ppm (以下 W/W) のソバを含む小麦粉 80g に水 35g、塩 0.8g を加えたドウ (直径 6cm、厚さ 1mm) を作製し、これを、以下の 4 通りの加熱処理；①焼く (160℃、10 分)、②揚げる (185℃、5 秒)、③蒸す (100℃、10 分)、④茹でる (100℃、10 分) を行なったものについて、スターチス標準試料と混合して、上記と同様、DNA 抽出を行なった後、配列番号 1 4 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号 1 5 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドからなるプライマーセット、および配列番号 6 4 記載の配列を有するプローブを用いて、該加熱後の試料に含まれるソバを定量した。測定された加工品中のソバの定量値をもとに、水分量を加

味して、使用した小麦粉中のソバ濃度に換算した結果、①焼いたもの：145ppm、②揚げたもの：56ppm、③蒸したもの：198ppm、④茹でたもの：143ppm であり、十分な定量性が示された。したがって、食品加工において、最も一般的な加熱処理である、焼く、揚げる、蒸すおよび茹でるのいずれの処理においても、本発明の方法による定量は可能であることが示唆され、このことから、これらの他の加工処理によってもその定量性を喪失することはないと考えられる。したがって、本発明の方法は、広範な加工食品に適用可能である。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

#### 産業上の利用の可能性

本発明の食品または食品原材料中に混入した特定植物属に属する植物を定量する PCR 法によると、食品または食品原材料中における特定植物属の植物の極微量の存在を検出するとともに定量することが可能であることから、ソバ属、落花生属、小麦属及び大豆属等のアレルギー原因となる植物属の植物の混入の有無の検出およびその定量をするのに特に有効である。また、被検対象とする試料毎の DNA 抽出効率や PCR 反応の阻害などの影響に対する補正の方法として、外部から精製 DNA を標準として添加して反応溶液中の PCR 反応の阻害などの影響に対する補正を行うのではなく、外部から精製 DNA 以外の標準植物試料を添加したサンプルから検出対象の特定植物属由来の DNA と標準植物由来の DNA を同時に抽出して定量的 PCR 法を行うことにより、標準植物試料と検出対象の特定植物属由来の試料との間で、DNA 抽出効率や PCR 反応の阻害などの影響が均一な条件で測定できるため、非常に信頼度の高い定量が可能である。また、DNA 抽出効率や PCR 反応の阻害等の影響、さらには被検対象とする試料中の DNA 含有量の違いに対しても補正が可能であるという、有利な効果を有している。また、例えば塩等の DNA を含有していない食品原材料または当該原材料を含む食品中の特定植物属に属する植物を適切に定量検出することも可能である。

したがって、本発明は、食品または食品原材料中に混入しているアレルギーの原因となる特定植物属に属する植物の定量的検出に有用である。さらに、PCR 法による定量分析は、偽陽性が出た場合に、その PCR 増幅産物を DNA 配列の解析に供することにより、

確実に偽陽性を除外することができるという点から、産業上利用性に優れているといえる。

さらに、本定量的 PCR 法によると、ELISA 法よりダイナミックレンジが広く、かつ食品または食品原材料中に混入した特定の原材料の定量的検出に十分な特異性および感度が高いものとすることができる。また、合成品（プライマー、プローブ）を使用することにより測定結果の再現性が高く、かつ信頼度も高いものとすることができる。

## 請求の範囲

1. PCR 法による食品または食品原材料中の特定植物属に属する植物を定量する方法であって、

検出対象である特定植物属由来の試料と標準植物試料とを予め定めた比率で混合した補正用サンプルを用意し、該サンプルからゲノム DNA を抽出すること、

被検対象である食品または食品原材料に既知量の標準植物試料を添加した被検サンプルを調製し、該サンプルからゲノム DNA を抽出すること、

検出対象である特定植物属由来の試料を検出するためのプライマーセット、および標準植物試料を検出するためのプライマーセットを用いて各サンプルから抽出したゲノム DNA をテンプレートとして定量的 PCR 法を実施すること、

補正標準値として、補正用サンプルについて上記定量的 PCR 法によって標準植物由来 DNA のコピー数／特定植物属由来 DNA のコピー数の値を求めること、ならびに

被検サンプルについて上記定量的 PCR 法によって特定植物属由来 DNA のコピー数／標準植物由来 DNA のコピー数の値を求め、これを上記補正標準値を用いて補正して、食品または食品原材料中に含まれる特定植物属の植物の量を算出すること、

を含む上記方法。

2. 定量的 PCR 法がリアルタイム PCR 法である、請求項 1 記載の方法。

3. リアルタイム PCR 法が、5' 末端に発光色素および 3' 末端に消光剤を有している、PCR プライマーセットの各オリゴヌクレオチドがハイブリダイズするゲノム DNA の部位の内側にハイブリダイズするプローブを用いて、発光量に基づいて DNA を定量する方法であって、ここで、プローブの 5' 末端の発光色素はその 3' 末端の消光剤によってその発光が抑制されているが、PCR 反応において Taq ポリメラーゼによってプライマーから DNA が伸長されると、Taq ポリメラーゼの 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性により上記プローブが分解され、発光色素と消光剤とが解離して発光を生じることを特徴とする、請求項 2 記載の方法。

4. 標準植物が、畑地雑草および食用作物以外の植物種に属するものである、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項記載の方法。

5. 標準植物が、スターチスである請求項 4 記載の方法。

6. 検出対象の特定植物属が、ソバ、落花生、小麦または大豆属である、請求項 1～5 のいずれか 1 項記載の方法。

7. 標準植物がスターチスであり、スターチス検出用プライマーセットが、配列番号 5 7 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号 5 8 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドとからなるセットであり、スターチス検出用プローブが、配列番号 5 9 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドである、請求項 2 または 3 記載の方法。

8. 検出対象の特定植物属がソバ属であり、ソバ属検出用プライマーセットが、配列番号 1 4 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号 1 5 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドとからなるセットであり、ソバ属検出用プローブが、配列番号 6 4 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドである、請求項 2 または 3 記載の方法。

9. 検出対象の特定植物属が落花生属であり、落花生属検出用プライマーセットが、配列番号 2 1 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号 2 6、6 5 または 6 6 記載のいずれかの配列を有するオリゴヌクレオチドとからなるプライマーセットであり、落花生属検出用プローブが、配列番号 3 4 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドである、請求項 2 または 3 記載の方法。

10. 配列番号 5 7 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号 5 8 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドとからなるスターチス検出用プライマーセット。

11. 配列番号 1 4 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号 1 5 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドとからなるソバ属検出用プライマーセット。

12. 配列番号 2 1 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号 2 6、6 5 または 6 6 記載のいずれかの配列を有するオリゴヌクレオチドとからなる落花生属検出用プライマーセット。

13. 食品または食品原材料中の特定植物属に属する植物を検出するための方法に用いるためのキットであって、標準植物試料検出用プライマーセットを含む、上記キット。

14. 標準植物試料検出用プローブをさらに含む、請求項 1 3 記載のキット。

15. 標準植物がスターチスであり、スターチス検出用プライマーセットが、配列番号 5 7 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号 5 8 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドとからなるセットである、請求項 1 3 または 1 4 記載のキット。

16. 配列番号59からなる配列を有する、スターチス検出用プローブをさらに含む、請求項15記載のキット。

17. 検出対象の特定植物属検出用プライマーセットをさらに含む、請求項13～16のいずれか1項記載のキット。

18. 検出対象の特定植物属がソバ属であり、その検出用プライマーセットが、配列番号14記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号15記載の配列を有するオリゴヌクレオチドとからなるセットである、請求項13～16のいずれか1項記載のキット。

19. 配列番号64からなる配列を有するソバ属検出用プローブをさらに含む、請求項18記載のキット。

20. 検出対象の特定植物属が落花生属であり、その検出用プライマーセットが、配列番号21記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号26、65または66記載の配列を有するオリゴヌクレオチドとからなるセットである、請求項13～16のいずれか1項記載のキット。

21. 配列番号34からなる配列を有する落花生属検出用プローブをさらに含む、請求項20記載のキット。

22. 標準植物試料としてスターチス試料をさらに含む、請求項15記載のキット。

23. 標準植物がスターチスであり、かつ、検出対象の特定植物属がソバ属であり、スターチスおよびソバについての検量線を作製するための、スターチスの増幅標的配列を含むDNAとソバの増幅標的配列を含むDNAとを連結して含む検量線作製用プラスミドをさらに含む、請求項13記載のキット。

24. 標準植物がスターチスであり、かつ、検出対象の特定植物属が落花生属であり、スターチスおよび落花生についての検量線を作製するための、スターチスの増幅標的配列を含むDNAと落花生の増幅標的配列を含むDNAとを連結して含む検量線作製用プラスミドをさらに含む、請求項13記載のキット。

25. 食品または食品原材料中のソバ属に属する植物を検出するための方法に用いるためのキットであって、配列番号14記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号15記載の配列を有するオリゴヌクレオチドとからなるソバ属検出用プライマーセットを含む、上記キット。

26. 配列番号64からなる配列を有するソバ属検出用プローブをさらに含む、請求項25記載のキット。

27. 食品または食品原材料中の落花生属に属する植物を検出するための方法に用いるためのキットであって、配列番号21記載の配列を有するオリゴヌクレオチドと、配列番号26、65または66記載の配列を有するオリゴヌクレオチドとからなる落花生属検出用プライマーセットを含む、上記キット。

28. 配列番号34からなる配列を有する落花生属検出用プローブをさらに含む、請求項27記載のキット。

図 1 A

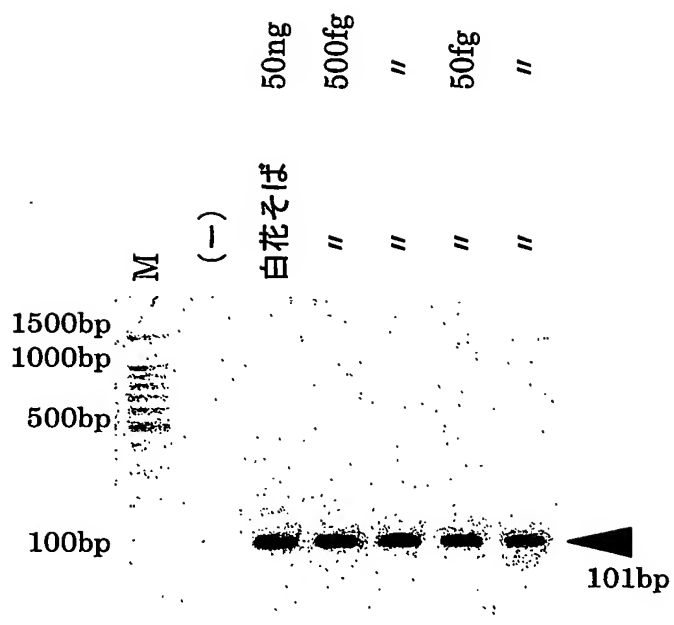
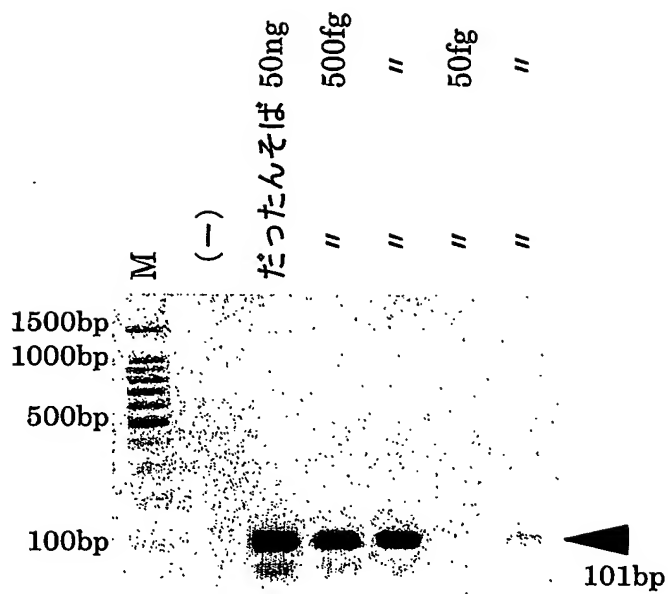
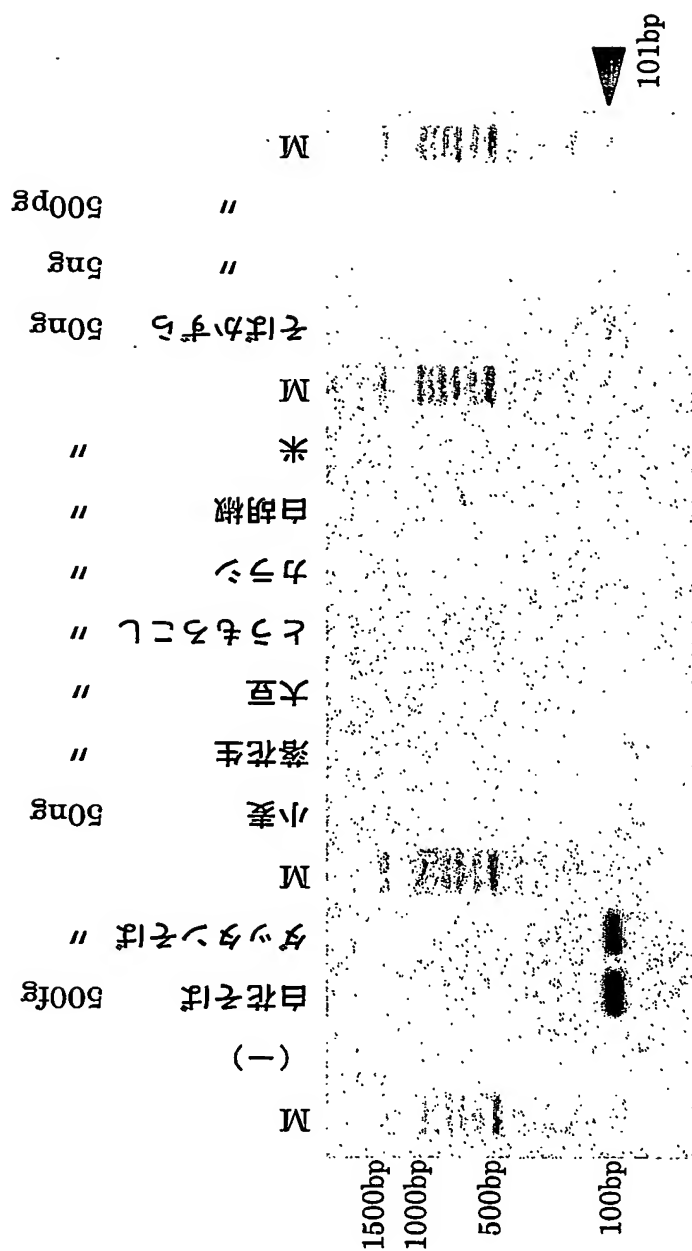
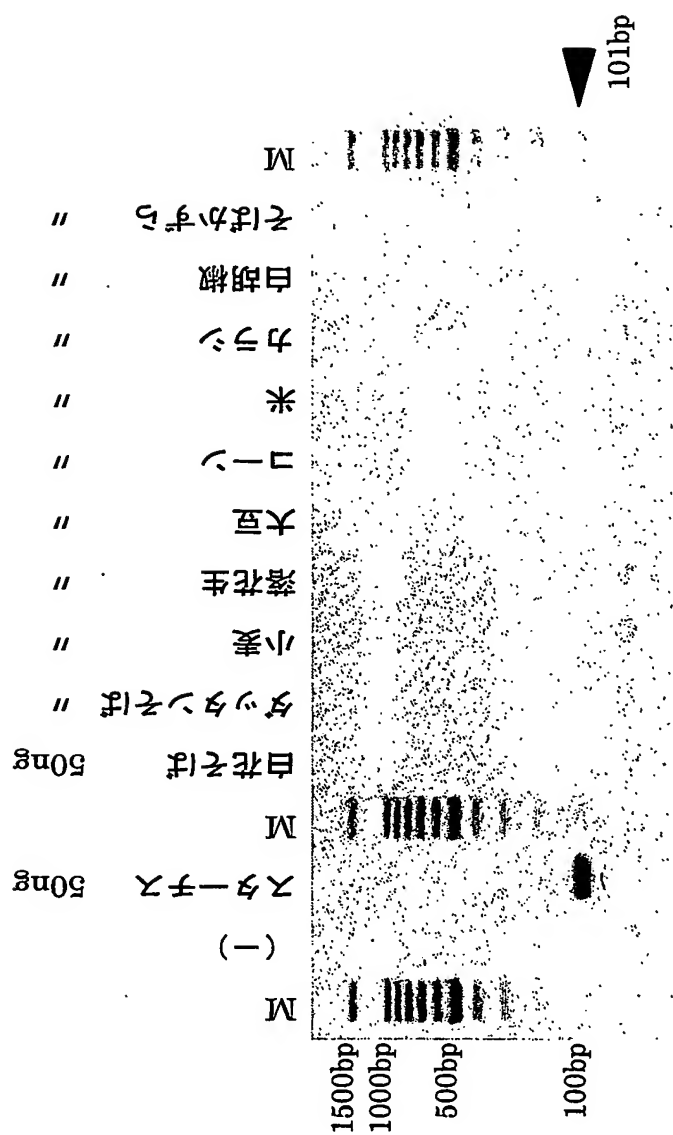




図 1 B







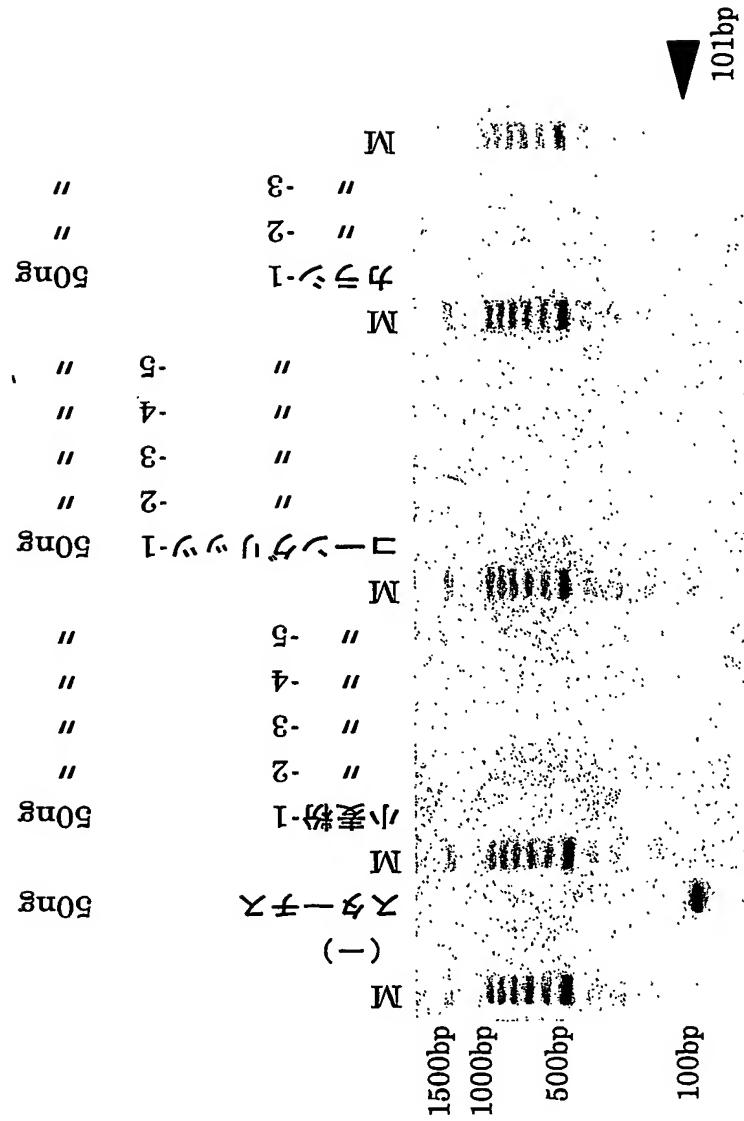
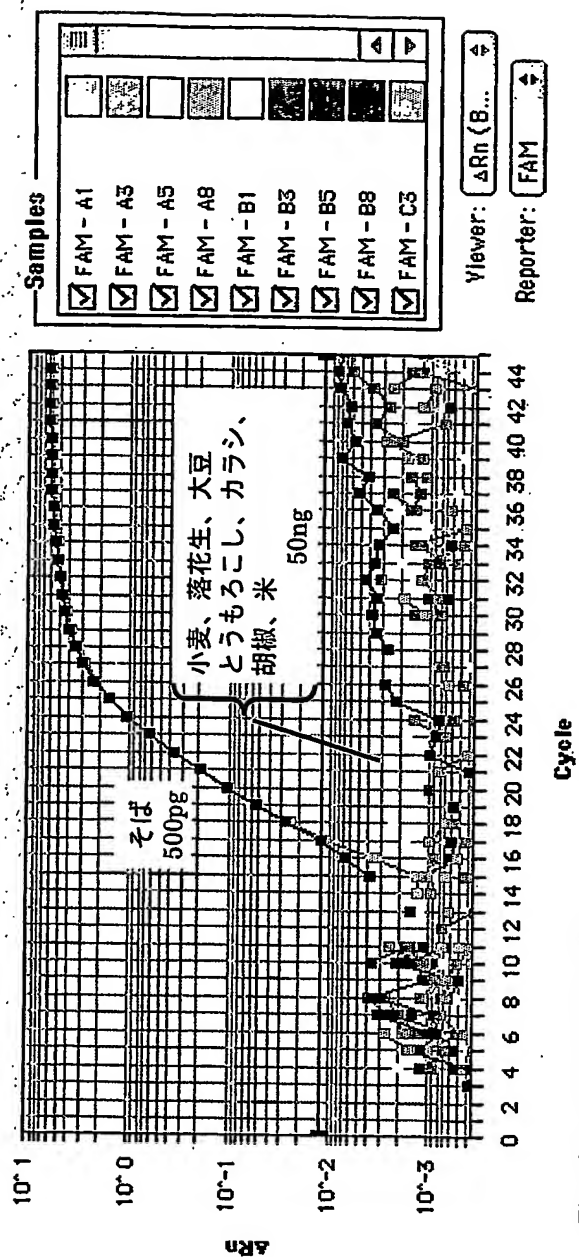


図 5 A

Amplification Plot - そば配列の定量PCR - 各種植物



Threshold Cycle Calculation

Use Threshold:

Mult. \* Stddev:  \*

Omit Threshold:

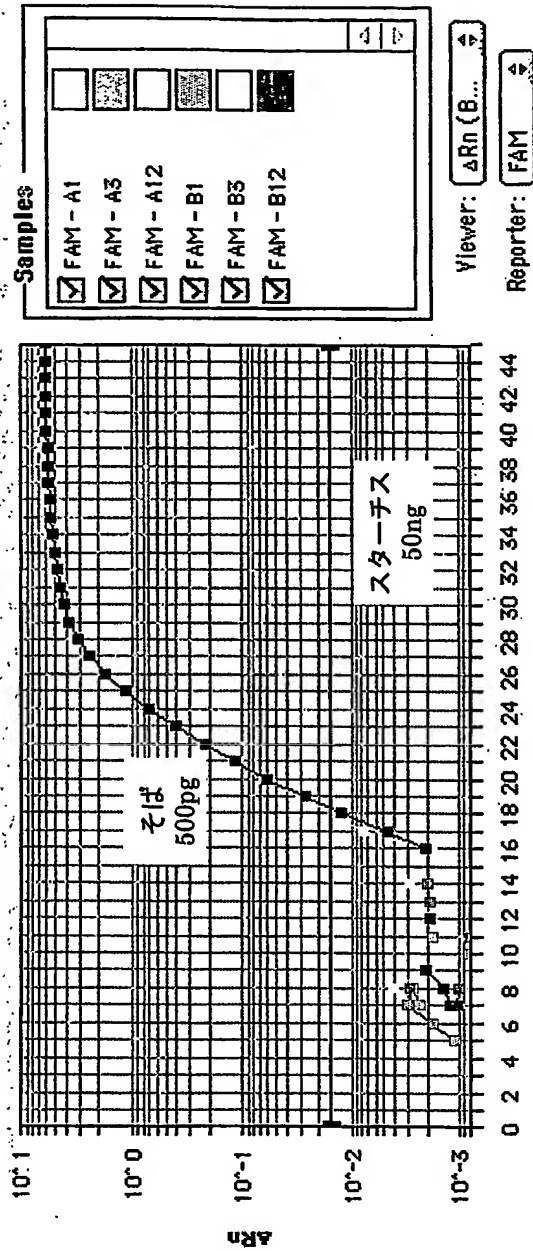
Baseline

Start:  Stop:

	Ct	Std Dev
FAM - A1	45.000	0.001
FAM - A3	45.000	0.001
FAM - A5	45.000	0.001
FAM - A8	45.000	0.002
FAM - B1	45.000	0.001

図 5 B

Amplification Plot - そば配列の定量PCR・スターチス



Threshold Cycle Calculation

Use Threshold:

Mult. \* Stddev:  \*

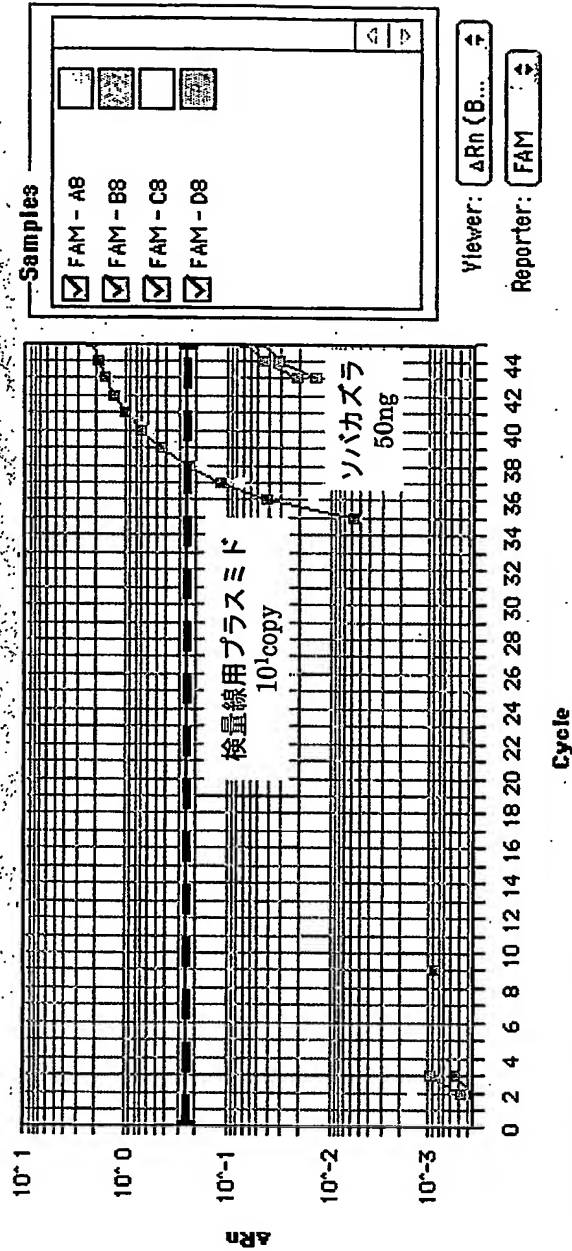
Omit Threshold:

Baseline

Start:  Stop:

	Ct	Std Dev
FAM - A1	45.000	0.001
FAM - A3	45.000	0.002
FAM - A12	18.099	0.002
FAM - B1	45.000	0.001
FAM - B3	45.000	0.002

Amplification Plot - そば配列の定量PCR - ソバカズラ



Threshold Cycle Calculation

Threshold

Use Threshold: 256

Suggest

Mult. \* Stddev: 256.0

\*

.001

Omit Threshold: 2.0

Base line

Start: 1

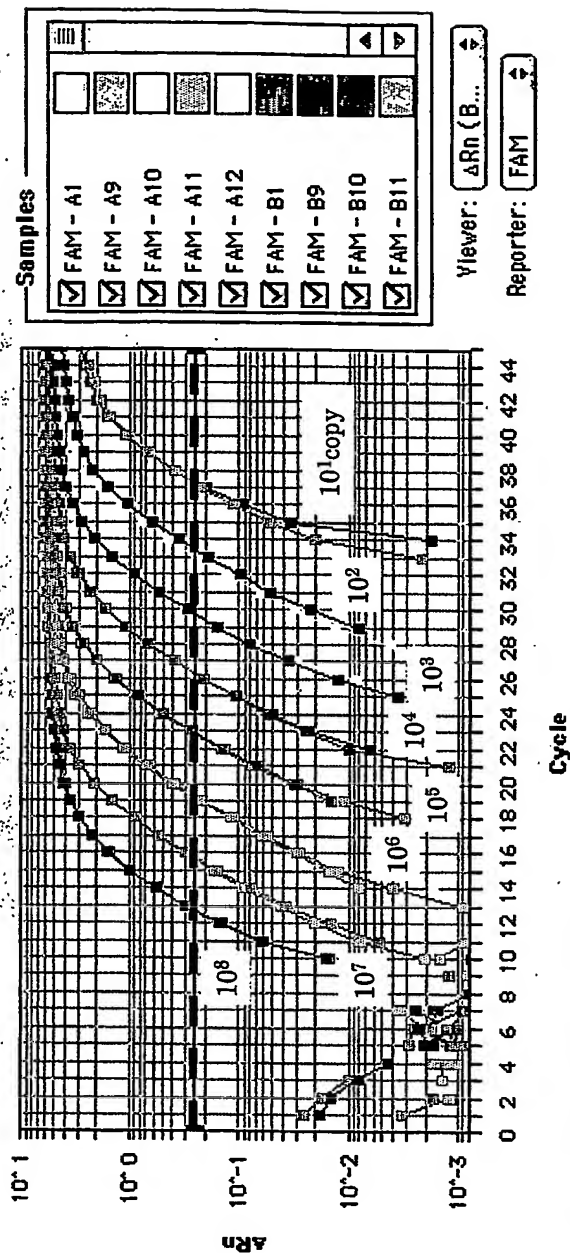
Stop: 4

Update Calculations

	Ct	Std Dev
FAM - A8	45.000	0.000
FAM - B8	45.000	0.001
FAM - C8	38.474	0.001
FAM - D8	38.090	0.001

図 7

Amplification Plot そば配列の定量PCR・検量線用プラスミド



Threshold Cycle Calculation

Use Threshold: 256 Suggest

Mult. \* Stddev: 128.0 \* .002

Omit Threshold: 2.0

Baseline

Start: 3 Stop: 10

Update Calculations

Sample	Ct	Std Dev
FAM - A1	45.000	0.002
FAM - A9	37.218	0.001
FAM - A10	29.707	0.001
FAM - A11	22.936	0.001
FAM - A12	15.681	0.002



8

Standard Curve そば配列の定量PCR

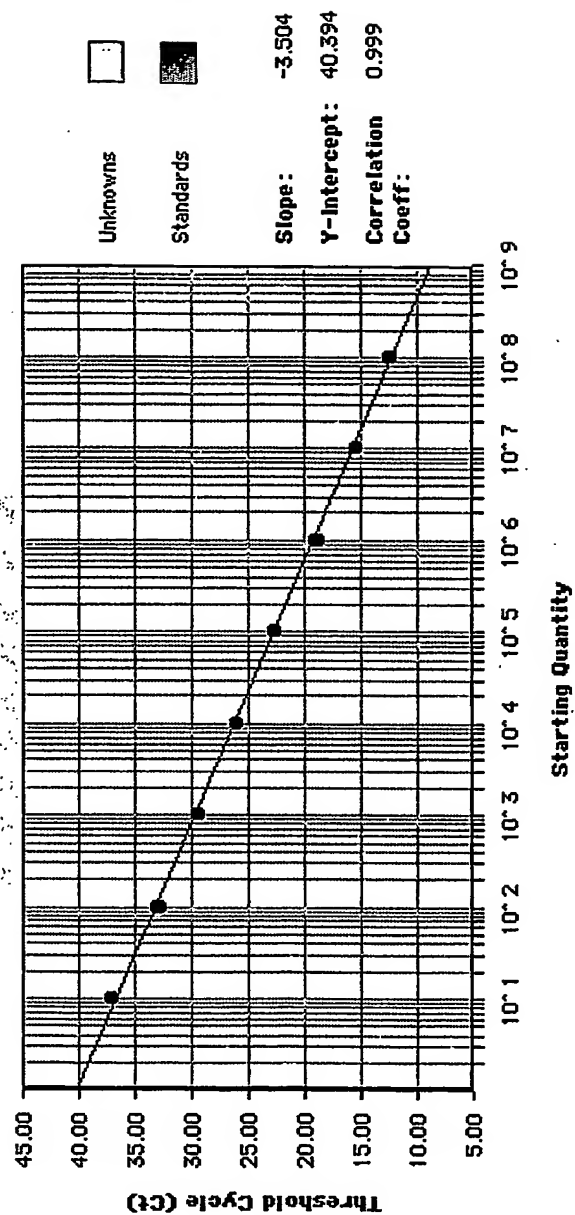


図 9

Amplification Plot - スタース配列の定量PCR - 各種植物

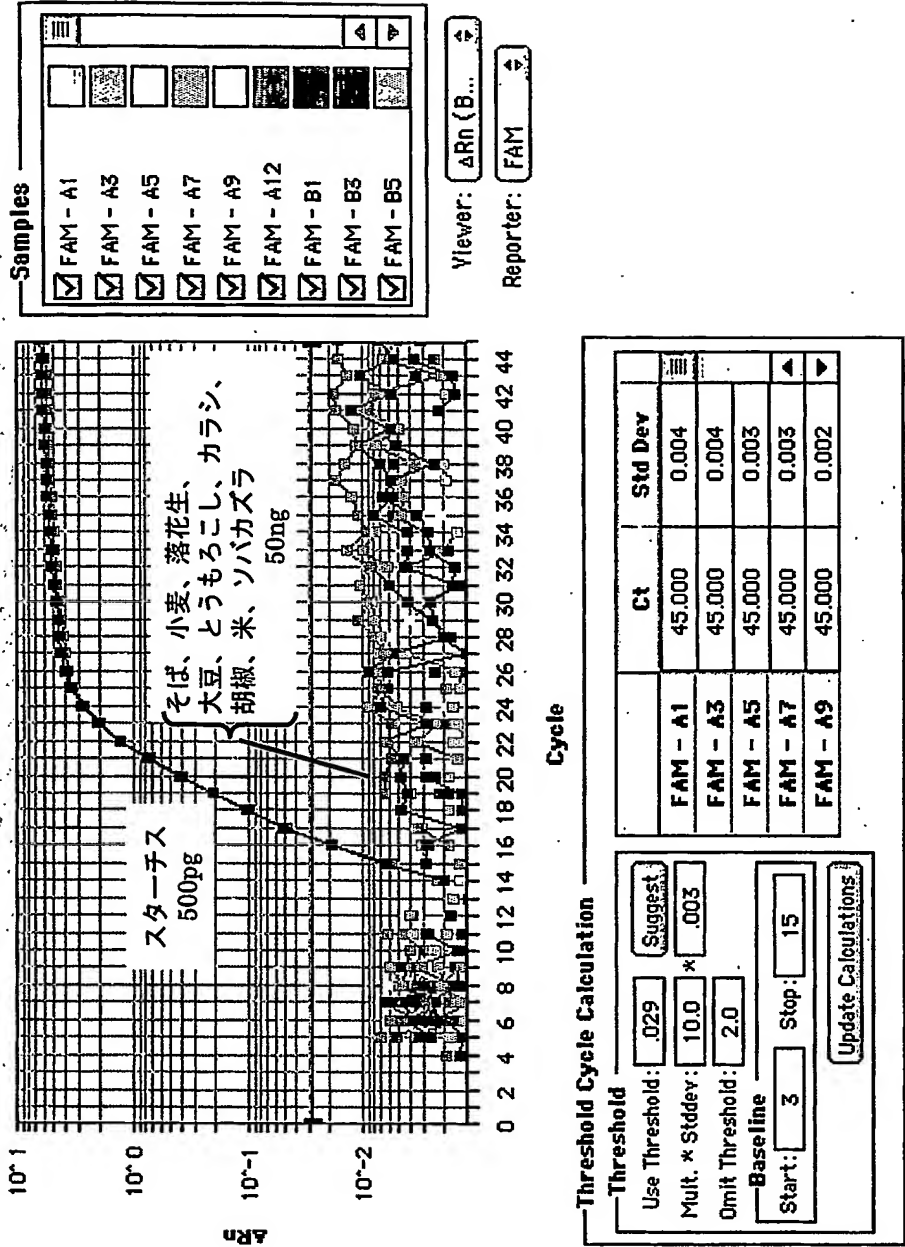
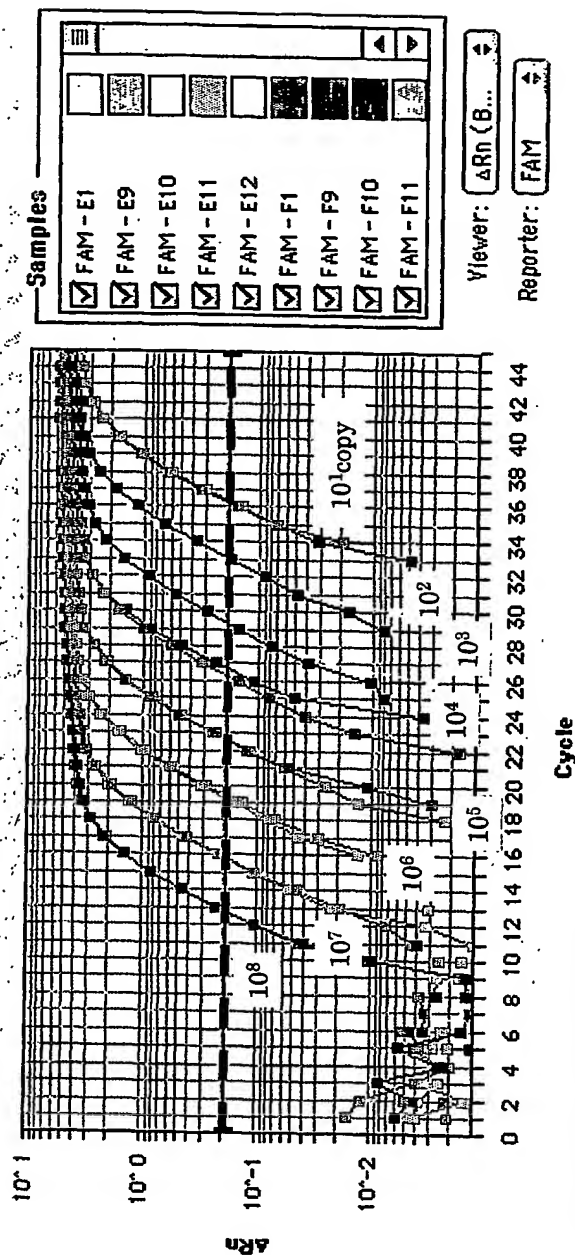


図 10

Amplification Plot - スタース配列の定量PCR - 検量線用プラスミド



Threshold Cycle Calculation			
Use Threshold:	.192	Suggest:	
Mult. * Stddev:	64.0	*	.003
Omit Threshold:	2.0		
Baseline			
Start:	3	Stop:	10
Update Calculations			

	Ct	Std Dev
FAM - E1	45.000	0.002
FAM - E9	36.293	0.003
FAM - E10	29.317	0.002
FAM - E11	22.567	0.002
FAM - E12	15.719	0.003

--- Threshold Line

図 11

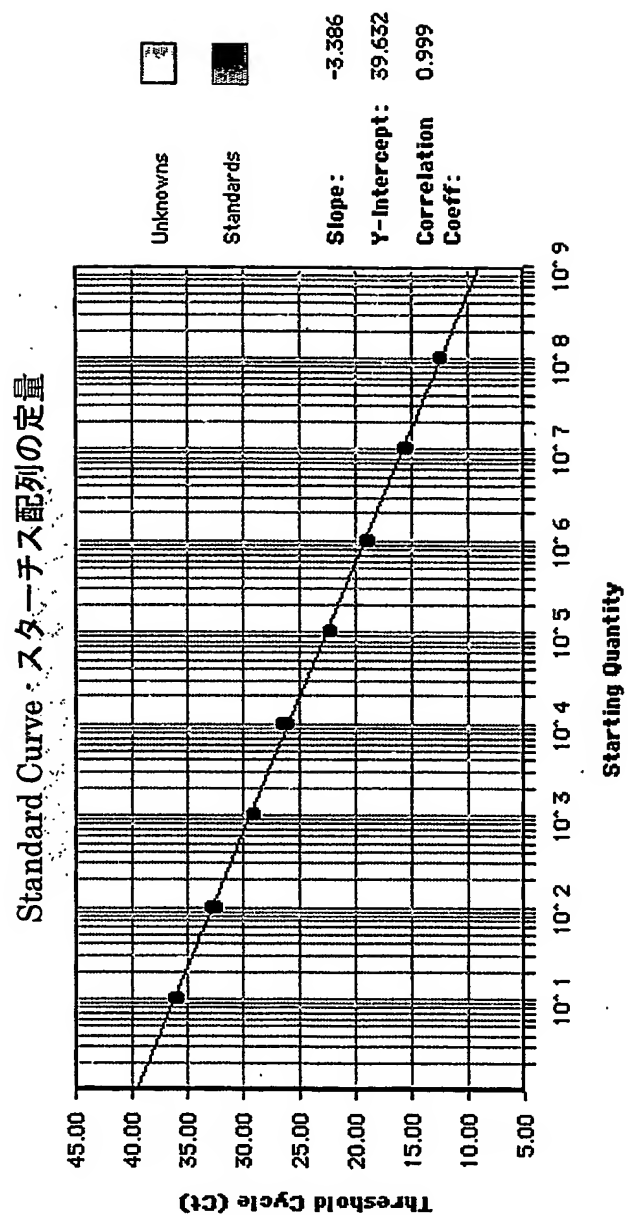


図 1 2

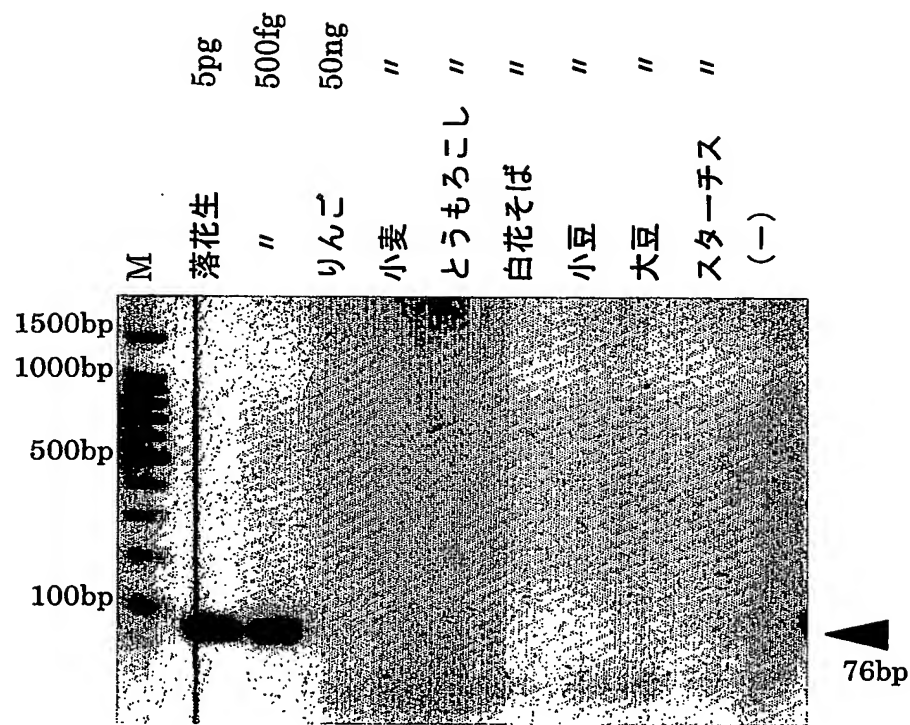


図 13

Amplification Plot - 落花生配列の定量PCR - 各種植物

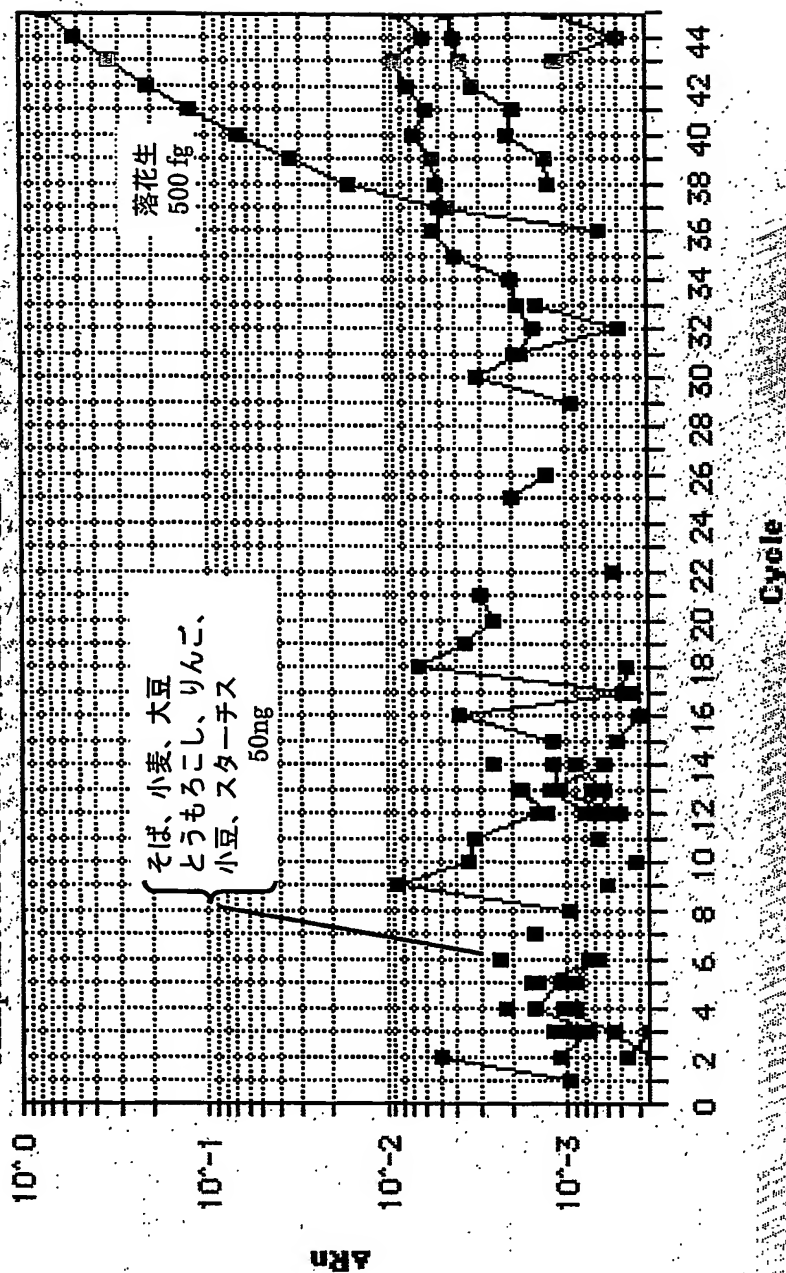


図 14

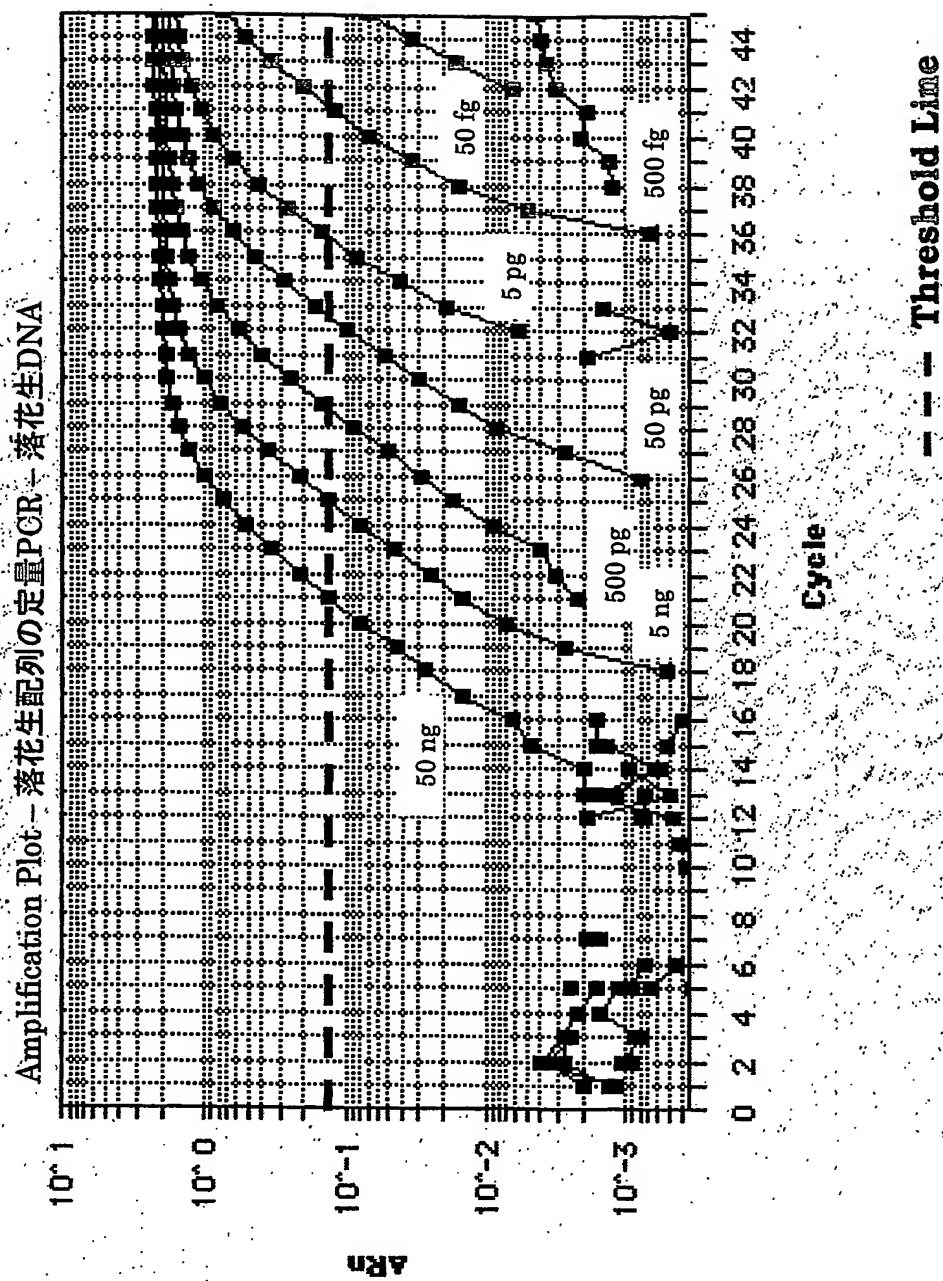
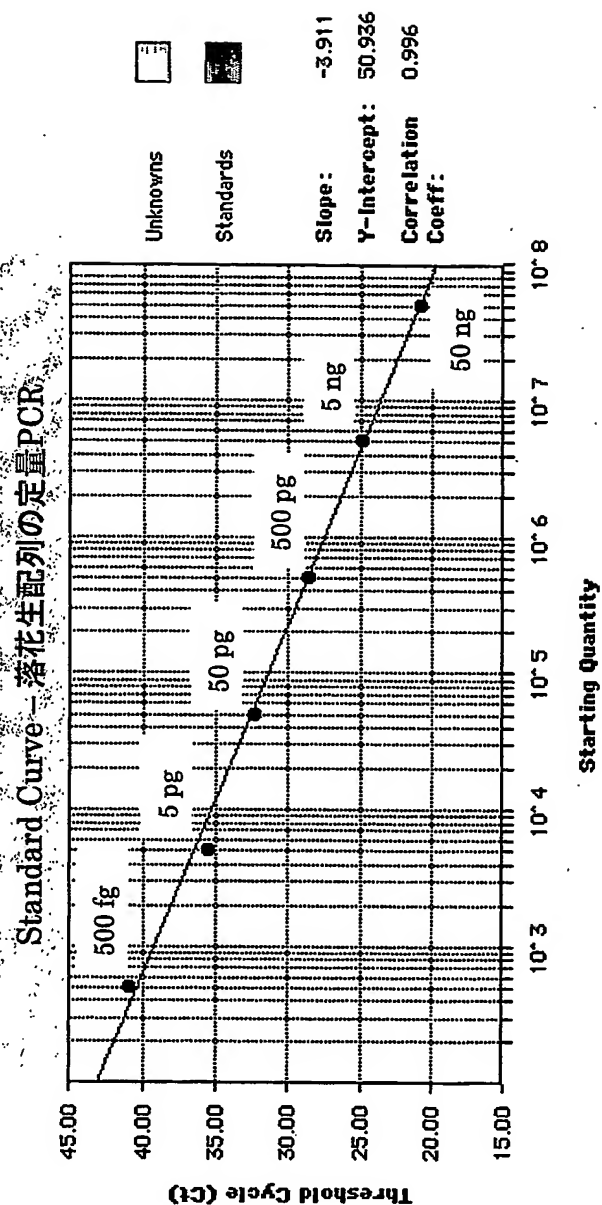


図 15





## SEQUENCE LISTING

<110> House Foods Corporation

<120> The quantitative PCR method of certain plants belonging to a genus of interest  
in food or food raw material

<130> PH-2153-PCT

<150> JP 2003-139513

<151> 2003-05-16

<160> 66

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 73

<212> DNA

<213> Fagopyrum esculentum

<400> 1

caacggatat ctcggtcttc gcatcgatga agaacgtagc gaaatgcgat acttggtgtg	60
aattgcagaa tcc	73

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 2

gcatttcgct acgttcttca tcgatgc

27

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 3

atcgcatctc gctacgttct tcatcg

26

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 4

agtatcgcat ttcgctacgt tcttcac

28

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 5

gcatcgatga agaacgtagc gaaatgc

27

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 6

cgatgaagaa cgtagcgaaa tgcgat

26

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

&lt;400&gt; 7

gatgaagaac gtagcgaaat gcgatact

28

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 71

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Fagopyrum esculentum

&lt;400&gt; 8

acgaaccccg gcgcggactg cgccaaggac cacgaacaga agcgcgtccc gagcctcccg 60

gtccccgggc g 71

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 77

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Fagopyrum esculentum

&lt;400&gt; 9

ccggcgggca cggcggcgtc gcgtcgtttc tacgaaacag aacgactctc ggcaacggat 60

atctcggctc tcgcatc 77

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 58

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Fagopyrum esculentum

&lt;400&gt; 10

gccggaaggg cgagctcccc cgaaacacca agtacggcgg gcggaccccg aaggccat 58

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 11

ggaccacgaa cagaagcgcg tcccg

25

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 12

cacgaacaga agcgcggtccc g

21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 13

ggaccacgaa cagaagcgcg t

21

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 14

cgccaaggac cacgaacaga ag

22

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 15

cgttgccgag agtcgttctg ttt

23

<210> 16

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 16

gtcgttctgt ttmktagaaa cgacgc 26

<210> 17

<211> 72

<212> DNA

<213> Arachis villosa

<400> 17

cgccccgtct caaacaagaa caaaacccccg gcgcggaaag cgccaaggaa gccaaacgtt 60

tctgctctcc cc 72

<210> 18

<211> 57

<212> DNA

<213> Arachis villosa

<400> 18

aacgtttctg ctctccccgc cggctccgga gacggcatcc ggtcggggcg acgagtg 57

<210> 19

<211> 60

<212> DNA

<213> *Arachis villosa*

<400> 19

ccgccggctc cggagacggc atccggtcgg ggcgacgagt gaccacaaga gttaagaacg 60

<210> 20

<211> 68

<212> DNA

<213> *Arachis villosa*

<400> 20

ggccggccgtg cgcggccgg cgcctcgtct caaacaagaa caaaaccccg gcgcggaaag 60

cgccaagg 68

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 21

gcggaaagcg ccaaggaagc 20

<210> 22

<211> 17

<212> DNA



<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 22

ggcgcggaaa gcgccaa

17

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 23

caaaaccccg gcgcggaaa

19

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 24

cggcttccgg agacggca

18

<210> 25

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 25

cggctccgga gacggca

17

<210> 26

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 26

cgtcgccccg accggat

17

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 27

tcgtcgcccc gaccggat

18

<210> 28

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 28

ctcgtcgccc cgaccggat

19

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 29

actcgtcgcc ccgaccggat

20

<210> 30

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 30

cgccccgtct caaacaagaa caaaaccc

28

<210> 31

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 31

ccccgtctca aacaagaaca aaaccc

26

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Arachis villosa

<400> 32

cgacgagtga ccacaagagt

20

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> *Arachis villosa*

<400> 33

aacgactctc ggcaacggat atct

24

<210> 34

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR probe

<400> 34

tgctctcccc gccggc

16

<210> 35

<211> 36

<212> DNA

<213> *Arachis villosa*

<400> 35

agaacaaaac cccggcgcgg aaagcgccaa ggaagc

36

<210> 36

<211> 53

<212> DNA

<213> Fagopyrum esculentum

<400> 36

agggcacgcc tgtctgggcg tcacgcaccg cgtcgcccc tccccctcct tcc 53

<210> 37

<211> 56

<212> DNA

<213> Fagopyrum esculentum

<400> 37

aagactacgc atcgcgtcgc gtcgccgcga gccccgggag gaaagacccg agagag 56

<210> 38

<211> 57

<212> DNA

<213> Arachis villosa

<400> 38

acgggctctt ggtggggagc ggcaccgcgg cagatggtgg tcgagaacaa ccctcgt 57

<210> 39

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 39

ccatctgccg cggtgcc

17

<210> 40

<211> 60

<212> DNA

<213> Triticum aestivum

<400> 40

tctcaacggg aatcgggatg cggcatctgg tccctcgtct ctcaaggac ggtggaccga 60

<210> 41

<211> 57

<212> DNA

<213> Triticum aestivum

<400> 41

taccgcgccg gacacagcgc atggtgggcg tccctcgctt atcaatgcag tgcattcc 57

<210> 42

<211> 57

<212> DNA

<213> Triticum aestivum

<400> 42

taccgtgtcg aacacagcgc atggtgggcg tctttgcttt atcaactgca gtgcata 57

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 43

cggcatctgg tccctcgtct 20

<210> 44

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 44

gcgaggacgc ccaccat 17

<210> 45

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial



<220>

<223> PCR primer

<400> 45

gcaaagacgc ccacat

17

<210> 46

<211> 58

<212> DNA

<213> Glycine max

<400> 46

gttgctgcgc ggggtglatg ctgacctccc gcgagcacc gcctcgtggt tggttgaa

58

<210> 47

<211> 65

<212> DNA

<213> Glycine max

<400> 47

gttcattggcc gacttcgccg tgataaaatg gtggatgagc cacgctcgag accaatcacg

60

tgcga

65

<210> 48

<211> 62

<212> DNA

<213> Glycine max

<400> 48

gttcatggcc gacttcgccg tgataaaatg gatgagccac gctcgaccaa acgtgcgacc 60  
gg 62

<210> 49

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 49

ctgacctccc gcgagcac 18

<210> 50

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 50

gcgtggctca tccaccattt tatca 25

<210> 51

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 51

gcgttgctca tccaccattt tatca

25

<210> 52

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 52

gcgttgctca tccaccattt tgtca

25

<210> 53

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 53

gcattgctca tccaccattt tgtca

25

<210> 54

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 54

gcgctgctca tccgccattt tgtca

25

<210> 55

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 55

gcgctgctca tccaccattt tgtca

25

<210> 56

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 56

gcgtggctca tccatttat ca

22

<210> 57

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 57

ttggacgtgt atcccttggtg gttc

24

<210> 58

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 58

cacgaagggtg aaagttgcgt tcat

24

<210> 59

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR probe

<400> 59

tgtgcgacgc ggaatg

16

<210> 60

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 60

tctagacgcc aaggaccacg aacagaag

28

<210> 61

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 61

caaaagcttc gttgccgaga gtcgttctgt tt

32

<210> 62

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 62

acgaagcttt tggacgtgtg tcccttgtgg ttc

33

<210> 63

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 63

ggatcccacg aaggtagaaag ttgcgttcac

30

<210> 64

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR probe

<400> 64

cgggacgcgc ttc

13

<210> 65

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 65

tcgtcgcccc gaccggatg

19

<210> 66

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 66

gtcgccccga ccggatg

17



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006913

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/29, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/29, C12N15/11-15/12, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), PUBMED, EMBL/DDBJ/Genbank/Geneseq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	"Allergy Busshitsu o Fukumu Shokuhin no Kensa Hoho ni Tsuite", Notice by Kaku Todofuken Chiji · Kaku Seireishi Shicho · Kaku Tokubetsuku Kucho Ate Kosei Rodosho Iyakukyoku Shokuhin Hoken Bucho, 06 November, 2002 (06.11.02), Shokuhatsu No.1106001	<u>13, 14, 17</u> 1-9, 15, 16, 18-28
<u>X</u> A	MATSUOKA T. et al., A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize, J.Food Hyg.Soc. Japan (2001), Vol.42, No.1, pages 24 to 32	<u>13, 14, 17</u> 1-9, 15, 16, 18-28
A	HUBNER P. et al., Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food, J.AOAC.Int. (2001), Vol.84, No.6, pages 1855 to 1864	1-9, 13-28

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
09 August, 2004 (09.08.04)

Date of mailing of the international search report  
24 August, 2004 (24.08.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006913

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHINDO Y. et al., Validation of real-time PCR analyses for line-specific quantitation of genetically modified maize and soybean using new reference molecules, J.AOAC.Int. (2002), Vol.85, No.5, pages 1119 to 1126	1-9,13-28
A	KURIBARA H. et al., Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean, J.AOAC.Int. (2002), Vol.85, No.5, pages 1077 to 1089	1-9,13-28
A	JP 2001-238700 A (Takara Shuzo Kabushiki Kaisha), 04 September, 2001 (04.09.01), & KR 200186586 A & US 2002/0100082 A	1-9,13-28
A	WO 02/34943 A1 (National Food Research Institute), 02 May, 2002 (02.05.02), & AU 200212678 A & EP 1335027 A1 & KR 2003051740 A & US 2004/0005605 A1 & BR 200114928 A	1-9,13-28
A	JP 2002-536024 A (BIOINSIDE GMBH.), 29 October, 2002 (29.10.02), & DE 19906169 A1 & WO 2000/47764 A2 & EP 1144676 A2 & DE 50002062 B & US 2003/0148278 A1	1-9,13-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006913

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☒

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☐

in written format

☒

in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☐

contained in the international application as filed

☒

filed together with the international application in computer readable form

☐

furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006913

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-9 and 14-28.

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006913

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

The invention relating to the method of determining the amount of arbitrary plant claimed in claim 1 and claims 2 to 9 quoting the same is common to the kit for detection of specified plant specimen including primers for detection of standard plant specimen claimed in claim 13 and claims 14 to 28 quoting the same only in relation to primers for detection of standard plant specimen for use in the detection of specified plant.

Moreover, the primer set for static detection claimed in claim 10, the primer set for buckwheat genus detection claimed in claim 11 and the primer set for peanut detection claimed in claim 12, as the primers without exception are not those employed only for the method of determining the amount of arbitrary plant involving the step of detecting the standard plant specimen and as the chemical structures of the primers are different from each other, are common to each other only in being the invention relating to primers for specific detection of individual plants.

However, the references 1 to 7 describe primers for specific detection of plants.

Consequently, being primers for specific detection of plants cannot be stated as constituting special technical features within the meaning of PCT Rule 13.2.

Therefore, the inventions of claims 1 to 28 cannot be stated as being a group of inventions linked with each other so as to form a single general inventive concept, and it appears that the invention group consists of four inventions, namely, those relating to the quantitative method and primer set therefor claimed in claims 1-9 and 14-28, the primer set for static detection claimed in claim 10, the primer set for buckwheat genus detection claimed in claim 11 and the primer set for peanut detection claimed in claim 12.

Reference 1: JP 2001-136983 A

Reference 2: JP 2001-238700 A

Reference 3: JP 2002-536024 A

Reference 4: JP 2003-135082 A

Reference 5: WO 02/34943 A

Reference 6: MATSUOKA T. et al., A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize, J. Food Hyg. Soc. Japan (2001), Vol.42, No.1, pages 24 to 32

Reference 7: "Allergy Busshitsu o Fukumu Shokuhin no Kensa Hoho ni Tsuite", Notice by Kaku Todofuken Chiji · Kaku Seireishi Shicho · Kaku Tokubetsuku Kucho Ate Kosei Rodosho Iyakukyoku Shokuhin Hoken Bucho, 06 November, 2002 (06.11.02), Shokuhatsu No.1106001

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int.Cl<sup>1</sup> C12N15/29, C12Q1/68

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C12N15/29, C12N15/11 - 15/12, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
JSTPlus, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), PUBMED  
EMBL/DDBJ/Genbank/Geneseq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	アレルギー物質を含む食品の検査方法について、各都道府県知事・各政令市市長・各特別区区長あて厚生労働省医薬局食品保健部長通知(2002年11月6日), 食発第1106001号	<u>13, 14, 17</u> 1-9, 15, 16, 18 -28
<u>X</u> A	MATSUOKA T. <i>et al.</i> , A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize, J. Food Hyg. Soc. Japan(2001), Vol. 42, No. 1, p. 24-32	<u>13, 14, 17</u> 1-9, 15, 16, 18 -28

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 08. 2004

国際調査報告の発送日

24. 8. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上 條 肇

4 B

9 4 5 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	HUBNER P. <i>et al.</i> , Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food, J.AOAC Int. (2001), Vol.84, No.6, p.1855-1864	1-9, 13-28
A	SHINDO Y. <i>et al.</i> , Validation of real-time PCR analyses for line-specific quantitation of genetically modified maize and soybean using new reference molecules, J.AOAC Int. (2002), Vol.85, No.5, p.1119-1126	1-9, 13-28
A	KURIBARA H. <i>et al.</i> , Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean, J.AOAC Int. (2002), Vol.85, No.5, p.1077-1089	1-9, 13-28
A	JP 2001-238700 A (寶酒造株式会社) 2001.09.04 &KR 200186586 A &US 2002/0100082 A	1-9, 13-28
A	WO 02/34943 A1 (独立行政法人食品総合研究所) 2002.05.02 &AU 200212678 A &EP 1335027 A1 &KR 2003051740 A &US 2004/0005605 A1 &BR 200114928 A	1-9, 13-28
A	JP 2002-536024 A (バイオインサイド ゲーエムベーパー) 2002.10.29 &DE 19906169 A1 &WO 2000/47764 A2 &EP 1144676 A2 &DE 50002062 B &US 2003/0148278 A1	1-9, 13-28

## 第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：



## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照のこと

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 1-9, 14-28

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## 第Ⅲ欄の続き

請求の範囲1及びそれを引用する請求の範囲2～9に記載された任意の植物の定量方法に係る発明、及び、請求の範囲13及びそれを引用する請求の範囲14～28に記載された標準植物試料検出用プライマーを含む特定植物試料検出用キットは特定植物を検出する際に用いる標準植物試料検出のためのプライマーに係るものである点においてのみ共通する。

また、請求の範囲10に記載されたスターチス検出用プライマーセット、請求の範囲11に記載されたソバ属検出用プライマーセット、請求の範囲12に記載された落花生検出用プライマーセットはいずれも標準植物試料検出工程を含む任意の植物の定量方法のために限って用いられるプライマーではなく、また、プライマーが有する化学構造は互いに異なっているから、それぞれ植物を特異的に検出するためのプライマーに係る発明である点においてのみ共通する。

しかしながら、文献1～7には植物を特異的に検出するためのプライマーが記載されている。

よって、植物を特異的に検出するためのプライマーであることはPCT規則13.2における特別な技術的事項であるとはいえない。

よって、請求の範囲1～28に記載された発明は、単一の一般的発明概念を形成するように互いに連関している一群の発明であるとはいえず、1～9、14～28に係る定量方法及びそのためのプライマーセット、請求の範囲10に記載されたスターチス検出用プライマーセット、請求の範囲11に記載されたソバ属検出用プライマーセット、請求の範囲12に記載された落花生検出用プライマーセットそれぞれに関する4個の発明からなる発明群であると認める。

文献1: JP 2001-136983 A

文献2: JP 2001-238700 A

文献3: JP 2002-536024 A

文献4: JP 2003-135082 A

文献5: WO 02/34943 A

文献6: MATSUOKA T. *et al.*, A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize, J. Food Hyg. Soc. Japan(2001), Vol. 42, No. 1, p. 24-32

文献7: アレルギー物質を含む食品の検査方法について、各都道府県知事・各政令市長・各特別区区長あて厚生労働省医薬局食品保健部長通知(2002年11月6日), 食発第1106001号